

Morgana Duarte da Silva

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA
DA ACUPUNTURA NO ACUPONTO “SPLEEN” 6 (SP6) EM
CAMUNDONGOS: ANÁLISE DOS SEUS MECANISMOS
NEUROBIOLÓGICOS**

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Neurociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto
Soares dos Santos.

Coorientador: Prof. Dr. Kathleen A.
Sluka.

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Morgana Duarte da
ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA
ACUPUNTURA NO ACUPONTO SPLEEN 6 (SP6) EM CAMUNDONGOS:
ANÁLISE DOS SEUS MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS / Morgana
Duarte da Silva ; orientador, Adair Roberto Soares dos
Santos ; co-orientador, Kathleen A. Sluka. -
Florianópolis, SC, 2013.
214 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências.

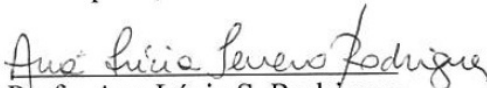
Inclui referências

1. Neurociências. 2. Acupuntura. 3. Nocicepção. 4. Dor.
5. Inflamação. I. Santos, Adair Roberto Soares dos. II.
Sluka, Kathleen A. . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV.
Título.

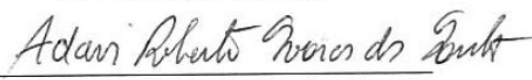
**“ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-
INFLAMATÓRIA DA ACUPUNTURA NO ACUPONTO
SPLEEN 6 (SP6) EM CAMUNDONGOS: ANÁLISE DOS
SEUS MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS”.**

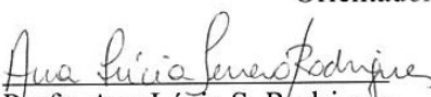
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no
Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina

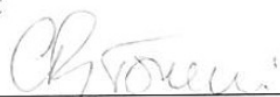
Florianópolis, 03 de abril de 2013.


Profa. Ana Lúcia S. Rodrigues
Coordenadora do Curso

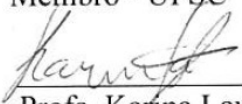
Banca Examinadora:


Prof. Adair Roberto S. dos Santos
Orientador – UFSC



Profa. Ana Lúcia S. Rodrigues
Membro - UFSC


Prof. Carlos Rogério Tonissi
Membro - UFSC


Prof. Everson Araújo Nunes
Membro - UFSC


Profa. Karina Laurenti Sato
Membro da Banca Externo


Prof. Li Shi Min
Membro - UFSC


Prof. Milton A. P. Oliveira
Membro da Banca Externo

Dedico este trabalho ao meu maior
exemplo de força... a quem estará
sempre ao meu lado, minha amada
irmã, Mariana Duarte da Silva (Dada).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao meu marido, Antonio Pedro, que me deu o ombro para chorar, mas que me fez olhar para frente e continuar... Obrigada por me deixar fazer parte da sua vida, por ser meu amigo, companheiro, meu amor, por me apoiar, compreender e ajudar... Você é o amor da minha vida!

Aos meus pais, João e Judith, pela educação, estrutura familiar e exemplo. Amo vocês!

À minha irmã, Dada, pelo incentivo, amizade e palavras de apoio e conforto. Mesmo quando mais sofria era só sorrisos a todos... Espero que um dia eu possa me perdoar... Sinto sua falta...

Ao professor Adair, meu orientador, pelos conselhos, discussões e broncas, apoio, risadas, ensinamentos, correções da Tese e por fim, pela orientação. Aprendi muito em todo o tempo de Landi e espero aprender ainda mais no futuro com você.

À minha co-orientadora professora Sluka, pela aceitação em seu laboratório, pela simpatia, educação, ajuda, orientação e correções. Obrigada pela oportunidade!

Aos meus tios-padrinhos, Lelé, Lula, Tetê e Totô, pelo amor, cuidado e conforto. Aos meus primos pela amizade e apoio emocional, especialmente ao Tuca e a Mary, por me aceitarem em seus aposentos e me receberem sempre tão bem.

Aos meus sogros, Adilson e Diná, e a minha cunhada Mila, pelo carinho, palavras de incentivo e por me tratarem sempre muito bem.

À Nega e família, pela dedicação, fidelidade e afeição.

À Karina que me auxiliou em todas as necessidades em Iowa, foi minha família, amiga e companheira de experimentos. Com palavras não poderia agradecer toda a ajuda que me deu...

À Karina, Luciana e Renata que ficaram do meu lado no dia mais difícil da minha vida, me dando apoio e ajuda... um dia espero poder agradecer vocês, porque foi muito importante pra mim...

Às queridas d. Jaqueline e d. Eunice pelo convívio, carinho e auxílio.

Aos amigos do laboratório pela ajuda, amizade, discussões e parceria porque sem eles com certeza não estaria aqui hoje: Cris Baggio, Marina, Fábio Gaúcho, Fran, Deise, Fernanda, Ney, Débora, Vanessa, Ismael, Cris Setim, Ana, Celeste, Dani Taga, Maria Fernanda, Chico, Ari, Tati, Bira, Serginho, Leidiane, Daniel, Murilo, Igão, Tátilla e Vini.

Ao saudoso povo de Iowa City pelas risadas, descontração, afeto e pelo importante apoio e amizade: Mommy, Tereza, Sandrita, Lynn, Muchacha, Nick, Dane e Audrey, Shui, Aline, Evelin, Vica, Brunos e Fabiana.

À Giselle Guginski (Gi), amiga e grande companheira de experimentos que iniciou comigo as pesquisas com o SP6. Participou ativamente de vários dos experimentos realizados nesta Tese e outros não apresentados aqui.

Ao Francisco Cidral (Chico) pela colaboração em vários experimentos, especialmente nos crônicos, por ceder seus finais de semana e tempo livre.

Ao Ari Ojeda Moré e a professora Elisa Cristiana Winkelmann Duarte pela ajuda na imunistoquímica com a cFos.

À Deise Prehs Montrucchio pela ajuda nos mecanismos de ação e discussões.

Á Camila Robl pelas avaliações de hipersensibilidade ao frio.

À Cristiane Hatsuko Baggio (Cris Baggio) pela realização das citocinas na peritonite e correções do paper.

À Maria Fernanda de Paula Werner pela ajuda na cirurgia de retirada da adrenal e correções do artigo.

Ao Rodrigo Marcon pela contagem de células e ajuda nas avaliações inflamatórias.

À Franciane Bobinski pela ajuda nos experimentos com inflamação muscular realizados no Brasil.

À Karina Laurenti Sato pela ajuda nos experimentos com inflamação muscular e imunos realizados em Iowa.

À Sandra Kolker pela ajuda na imuno realizada em Iowa e fotos dos músculos.

À Lynn Rasmussen por comprar todo o material necessário à realização dos experimentos em Iowa.

Ao Jian Shao, querido e prestativo técnico da Universidade de Iowa, pelos cursos para usar os microscópios e criostato, pela ajuda e pelas brincadeiras.

Aos professores da Pós Graduação pelos ensinamentos, especialmente as professoras Ana Lúcia e Carla Tasca que foram coordenadoras da Neurociências no período do meu Doutorado.

Ao professor Giles Alexander Rae pelas conversas sobre experimentos, sugestões, idéias e suporte em seu laboratório.

Ao Nivaldo Manuel Vicente (Nivaldinho) por toda ajuda (e muita!), todas as conversas e todo carinho.

Ao Seu Carlinhos e a Dona Vilma, sempre disponíveis, gentis e muito queridos.

Agradeço especialmente aos amigos: Marina, Deise, Fran, Fernanda e Ari pelas correções da Tese. Ao meu marido, Antonio, pela correção ortográfica da mesma.

Agradeço também a todos que trabalharam comigo em experimentos com acupuntura que não estão na Tese: Fábio Rodrigo Mesquita Borges, Marina Machado Córdova, Celeste Cabrera (minha querida I.C.!), Tatila

de Souza Barcala, Daniela Tagliari Longhi Balbinot, Vanessa Erthal, Leidiane Mazzardo-Martins, Luciana Sanada, Jing Fortes-Danielson, Rafael Dutra, Mônica Pessi e professor Eduardo Cargnin Ferreira, entre outros que posso ter esquecido.

À Universidade Federal de Santa Catarina, CNPq, LANDI, e Universidade de Iowa pelo apoio financeiro, especialmente à CAPES pela implementação das Bolsas de Estudo (Doutorado e Doutorado Sanduíche).

“A coisa mais indispensável a um homem é
reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio
conhecimento”.
(Platão, 427 a 347 a.C.)

RESUMO

A acupuntura é uma técnica milenar usada, entre outras aplicações, para o alívio da dor. Neste trabalho buscou-se verificar o efeito da acupuntura e seus mecanismos de ação em modelos de nocicepção e inflamação em camundongos. A acupuntura manual (AM) foi realizada no acuponto SP6 (Spleen 6) e reduziu a nocicepção aguda induzida por ácido acético (AA) e pela formalina. O melhor perfil antinociceptivo foi obtido através de inserção e retenção da agulha por 10 minutos, sendo que seu efeito perdurou por 120 minutos. Verificou-se também que a integridade das fibras aferentes primárias, em especial do tipo C, foi essencial para o efeito da AM no acuponto SP6. Além disto, foi observado que o SP6 foi o acuponto que reduziu de forma mais significativa a nocicepção aguda causada pelo AA e formalina quando comparado com os acupontos ST35, BL57, KI3, GB39, LR5 e um não acuponto. A estimulação do acuponto SP6 também foi efetiva em reduzir a dor neuropática, caracterizada pela hipersensibilidade mecânica (HM) e térmica (calor) induzidas pela ligadura parcial do nervo ciático. É importante salientar que a redução da HM permaneceu inicialmente por 1 hora, porém, se prolongou por 6 horas (com 5 tratamentos) e depois 60 horas (com 10 tratamentos). Verificou-se que a administração prévia de antagonista de receptores kappa (κ) opióides, colinérgicos (muscarínico e nicotínico), dopaminérgicos (D2) e adenosinérgicos (A1 periféricamente), preveniram o efeito antinociceptivo do SP6 no modelo do AA. Observou-se também que houve maior atividade da proteína cFos em áreas do encéfalo envolvidas na dor como o locus coeruleus (LC), a substância cinzenta periaquetal (PAG), o núcleo magno da rafe (rafe), o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), o hipocampo e a amígdala central (Ace), após a AM. A AM no SP6 reduziu o número total de leucócitos, o número de neutrófilos, a atividade da mieloperoxidase, a permeabilidade capilar e restabeleceu os níveis de citocinas IL(interleucina)-10 na cavidade peritoneal de animais submetidos a peritonite induzida por carragenina, sendo que este efeito foi em parte dependente de glicocorticóides endógenos. A estimulação do acuponto SP6 também reduziu a HM e térmica (calor) em camundongos que receberam carragenina (3%) via intramuscular, além de restabelecer os níveis de IL-10 no músculo. Além disto, a AM no SP6 foi capaz de alterar o número de macrófagos anti-inflamatórios com fenótipo M2 em relação aos macrófagos inflamatórios M1, sem promover aumento no número total de macrófagos no músculo dos animais que receberam carragenina. Ainda, os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da AM

no SP6 não foram observados em animais nocautes para a citocina IL-10. Assim, os nossos dados estendem os dados da literatura e permitem sugerir que a AM no SP6 possui efeito antinociceptivo e anti-inflamatório pronunciado, devido a liberação de IL-10.

Palavras-chave: Acupuntura, nocicepção, dor, inflamação.

ABSTRACT

Acupuncture is a millenary treatment for pain and other illnesses. The objective of this study was to evaluate the acupuncture antinociceptive and anti-inflammatory effect and its mechanisms of action in mice. The manual acupuncture (MA) was given in SP6 acupoint (Spleen 6) and it relieves the nociception in the acetic acid (AA) and formalin models. The SP6 MA treatment was standardized and we found its better antinociceptive effect with 10 min of needle retention time and lasted until 120 minutes. Our results show that activation of peripheral nerve fibers and mainly capsaicin-sensitive C-fibers play a critical role in the antinociception caused by SP6 MA. SP6 MA has more pronounced antinociceptive effect than other acupoints (ST35, BL57, KI3, GB39, LR5) and a non-acupoint (NA) (AA e formalin models). SP6 MA reduced mechanical and thermal hypersensitivity (heat) induced by a neuropathic pain model. The mechanical hypersensitivity reduction lasted 1 hour (1 treatment), up to 6 hours (after 5 treatments) and up to 60 hours (after 10 treatments). SP6 antinociceptive effect is opioid- (κ), cholinergic- (muscarinic and nicotinic), dopaminergic- (D2) and adenosinergic- (A1- peripherally) dependent. SP6 MA activates specific encephalic areas: locus coeruleus (LC), raphe magnos nuclei (Raphe), periaqueductal gray (PAG), paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN), central amygdala (Ace) and hippocampus areas, SP6 MA reduced leukocyte and differential cell counts (neutrophils and mononuclear), myeloperoxidase activity, vascular permeability and increased interleukin-10 (IL-10) levels in carrageenan-induced peritonitis in mice, and these effects depend on the adrenal glands. Besides, SP6 MA relieves pain and inflammation in a model of inflammatory muscle pain induced by 3% carrageenan. SP6 MA reduced heat and mechanical hypersensitivity in mice that was dependent on local increases of IL-10 in mice's muscle. SP6 MA resulted in a phenotypic switch of muscle macrophages with reduced M1 macrophages (pro-inflammatory) and increased M2 macrophages (anti-inflammatory and important IL-10 source). Furthermore, SP6 MA reduced mechanical hypersensitivity, escape-avoidance behaviors, and edema and it had no effect in IL-10 knockout mice. SP6 MA antinociceptive effect depends on endogenous receptors and it activates encephalic areas that participate in central mechanisms of pain. MA produces its effects locally by increasing production and release of IL-10, to reduce pain and inflammation.

Keywords: Acupuncture, nociception, pain, inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias de dor da periferia até o encéfalo.....	36
Figura 2 - A complexidade molecular do neurônio aferente primário nociceptivo com liberação de mediadores inflamatórios no local da lesão tecidual.....	40
Figura 3 - Migração de leucócitos para os locais da inflamação.....	52
Figura 4 - Representação do músculo com uma UNA em resposta aos estímulos manuais com a agulha.....	64
Figura 5 - Efeito antinociceptivo da acupuntura através da ativação de receptores A1 (A1R) pela adenosina.....	66
Figura 6 - Fotos demonstrando as etapas para o tratamento com acupuntura.....	75
Figura 7 - Fotos dos animais com agulhas inseridas.....	80
Figura 8 - Demonstração esquemática dos acupontos.....	80
Figura 9 - Localização anatômica da realização da cirurgia de ligadura parcial do nervo ciático (LPNC).....	83
Figura 10 - Demonstração da disposição do animal e do filamento de von Frey para avaliação de hipersensibilidade mecânica em camundongos.....	85
Figura 11 - Representação de um aparelho de Hargreaves, usado para avaliação de hipersensibilidade térmica ao calor em camundongos.....	86
Figura 12 - Foto de um camundongo sobre a Placa Fria (AVS-CQF, São Paulo, Brasil), usada na avaliação da hipersensibilidade térmica ao frio.....	88
Figura 13 - Efeito antinociceptivo do acuponto SP6 em camundongos submetidos ao modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	90

Figura 14 - Estimulação do acuponto SP6 induz efeito antinociceptivo somente quando a agulha é inserida ipsilateralmente à lesão.....	92
Figura 15 - Envolvimento de fibras nervosas periféricas na antinocicepção causada pelo tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6.....	94
Figura 16 - Efeito do tratamento com acupuntura nos acupontos SP6, ST35, BL57, KI3, GB39, LR5 e no não acuponto (NA), nos modelos de nocicepção induzidos por ácido acético ou formalina em camundongos.....	96
Figura 17 - Efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 na hipersensibilidade mecânica induzida pela LPNC em camundongos....	99
Figura 18 - Efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 na hipersensibilidade térmica ao calor e ao frio induzida pela LPNC em camundongos.....	100
Figura 19 - Esquema de tratamentos com os antagonistas e agonistas para avaliar os efeitos neurobiológicos da acupuntura realizada no acuponto SP6.....	102
Figura 20 - Envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no SP6, no modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	109
Figura 21 - Envolvimento do sistema colinérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no SP6, no modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	110
Figura 22 - Envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no SP6, no modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	111

Figura 23 - Envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no SP6, no modelo de nocicepção induzido por ácido acético.....	113
Figura 24 - Avaliação do sistema serotoninérgico e adrenérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no SP6, no modelo de nocicepção induzido por ácido acético.....	115
Figura 25 - Fluxograma dos procedimentos experimentais na indução e avaliação da peritonite induzida por carragenina.....	119
Figura 26 - Efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 ou da dexametasona i.p. (DEXA) na peritonite induzida por carragenina em camundongos	124
Figura 27 - Efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 ou da dexametasona i.p. sobre os níveis de TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-10 (C) no exsudato inflamatório induzido pela injeção de carragenina i.p. em camundongos.	125
Figura 28 - Efeito da acupuntura manual no ponto SP6 ou da dexametasona i.p. na peritonite induzida por carragenina em camundongos que sofreram ou não adrenalectomia.....	127
Figura 29 - Representação do sistema de avaliação de força (Force Gauge, Instrutherm, Brasil), utilizado no teste de preensão plantar para avaliação da hipersensibilidade mecânica.....	130
Figura 30 - Efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 na hipersensibilidade mecânica térmica induzida por carragenina i.m. em camundongos.....	136
Figura 31 - Efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 sobre os níveis de citocinas IL-10 no músculo gastrocnêmio em animais com dor muscular induzida por carragenina.....	137

Figura 32 - Efeito da acupuntura manual no SP6 sobre a hipersensibilidade mecânica e edema induzida pela carragenina em animais C57BL/6 e animais nocaute para a citocina IL-10 (IL-10-/-).	136
Figura 33 - Efeito da acupuntura manual no SP6 sobre a quantidade total e diferencial de macrófagos.....	142
Figura 34 - Imunohistoquímica do músculo gastrocnêmio em animais do grupo Controle, SP6 e IL-/- SP6.....	143
Figura 35 - Representação do acuponto SP6 em humanos e camundongos.....	146
Figura 36 - . Circuito central da analgesia por acupuntura.....	164
Figura 37 - Vias anti-inflamatórias - difusa e neural.....	169
Figura 38 – Indução da peritonite pela carragenina e efeito da acupuntura no acuponto SP6 sobre este modelo inflamatório.....	170

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1R - receptor 1 de adenosina
ACe - núcleo central da amígdala
ADP - adenosina difosfato
ADX - adrenalectomia bilateral
AMP - adenosina monofosfato
AMPA - alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AMPc - adenosina monofosfato cíclico, via proteína quinase
AP-1 – ativador de proteína 1
Arc - núcleo arqueado
ASICs - canais iônicos sensíveis a ácido
ATP - adenosina trifosfato
AVE - acidente vascular encefálico
BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro
BK – bradicinina
BRV - bulbo ventromedial rostral
CCC - Constrição crônica do nervo ciático
CCK-8 - colecistoquinina octapeptídeo
Cd - núcleo caudado
CEUA - Comissão de Ética do Uso de Animais
CFA - adjuvante completo de Freund
c-fos - proteína oncogênica (controle da divisão/diferenciação celular e tradução protéica)
cGMP - monofosfato cíclico de guanosina
CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CHA - agonista seletivo de receptores adenosinérgicos A1
CO – grupo operado
CPNC - Constrição parcial do nervo ciático
CTOP - antagonista opióide seletivo para receptor μ opióide
DAB – diaminobenzidina
dCF – deoxicoformicina
DNIC - controle inibitório difuso da dor
DOI - agonista seletivo do receptor 5-HT_{2A}
DPCPX - antagonista seletivo de receptores adenosinérgicos A1
E.P.M.- erro padrão da média
ELISA - imunoenensaio de enzima
FO – falso operado

GD – giro denteado
GDNF - fator de crescimento derivado de células gliais
GLU – Glutamato
GRD - gânglio da raiz dorsal
H⁺ - hidrogênio
Hab- núcleo habenular
HPA - hipotálamo-hipófise (pituitária)-adrenal
i.p. - injeção intraperitoneal
i.pl. - injeção intraplantar
I.R. – intensidade de radiação
IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor
IBRA - Instituto Brasileiro de Acupuntura
ICAM - moléculas de adesão intercelular
IL – interleucina
iNOS - óxido nítrico sintase
KATP - ATP sensível a potássio
LANDI - Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação
LC - locus coeruleus
LLN - Lesão limitada do nervo
LNE - Ligação de nervos espinais
LPNC - ligadura parcial do nervo ciático
M1 - macrófagos do tipo M1, classicamente ativados
M2 – macrófagos do tipo M2, alternativamente ativados
MK-801 - antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA
MPO - enzima mieloperoxidase
MTC - Medicina Tradicional Chinesa
NA - não-acuponto
NGF - fator de crescimento do nervo
NIH - National Institute of Health
NMDA - N-metil-D-aspartato
NO - óxido nítrico
Nor – BNI - antagonista seletivo para receptor Kappa opióide
NT – neurotrofina
OMS - Organização Mundial de Saúde
PAG - substância cinzenta periaquedutal
PAP - ectonucleotidase fosfatase ácida prostática
PBS - tampão fosfato-salino
Pf - núcleo parafascicular

PFA - paraformaldeído
PGE2 - prostaglandina E2
PGs – prostaglandinas
PKG - proteína quinase G
PMSF - flúor fenilmetanossulfonil
PPARY - Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama
PVN - núcleo paraventricular do hipotálamo
Rafe - núcleo magno da Rafe
ROS - espécies reativas de oxigênio
SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida
SNC - sistema nervoso central
SNP - sistema nervoso periférico
SP - substância P
SP6 - Spleen 6
ST36 – Stomach 36
ST37 – Stomach 37
Th - células T helper
TNF- α - fator de necrose tumoral α
TrKA - receptores de tirosina quinase A
TRP - receptores de potencial transiente
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
UNA - unidade neural de acupuntura
VLF - funículo ventrolateral
VPLn Tálamo - núcleo ventro póstero lateral do tálamo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	33
1.1	DOR E NOCICEPÇÃO.....	33
1.1.1	Circuitos neurais da nocicepção.....	34
1.1.2	Dor crônica.....	43
1.2	PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	48
1.3	MODELOS ANIMAIS DE NOCICEPÇÃO E INFLAMAÇÃO.....	54
1.3.1	Modelos de nocicepção aguda.....	55
1.3.2	Modelos de inflamação e de nocicepção crônica.....	56
1.4	TRATAMENTO DA DOR COM ACUPUNTURA.....	60
1.4.1	Como a acupuntura exerce seu efeito na dor.....	61
1.4.2	Pontos de acupuntura.....	66
2	JUSTIFICATIVA.....	70
3	OBJETIVO.....	72
3.1	OBJETIVO GERAL.....	72
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	72
4	METODOLOGIA E RESULTADOS.....	73
4.1	ANIMAIS.....	73
4.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
4.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	74
4.4	PARTE I: EFEITO DA ACUPUNTURA MANUAL EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO AGUDA.....	75
4.4.1	Metodologia.....	75
4.4.1.1	Tratamento com acupuntura no acuponto SP6.....	75
4.4.1.2	Padronização do tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6.....	76

4.4.1.2.1	<i>Modelo de nocicepção induzida por ácido acético.....</i>	<i>76</i>
4.4.1.2.2	<i>Modelo de nocicepção induzida pela formalina.....</i>	<i>77</i>
4.4.1.3	Avaliação de vias periféricas envolvidas na antinocicepção da acupuntura manual no acuponto SP6.....	78
4.4.1.3.1	<i>Participação das fibras sensoriais sensíveis à capsaicina no efeito da acupuntura.....</i>	<i>78</i>
4.4.1.3.2	<i>Participação de fibras nervosas periféricas no efeito da acupuntura.....</i>	<i>79</i>
4.4.1.4	Especificidade do efeito da acupuntura em diferentes acupontos.....	79
4.4.1.4.1	<i>Avaliação da especificidade do efeito da acupuntura em diferentes acupontos na nocicepção induzida pelo ácido acético.....</i>	<i>81</i>
4.4.1.4.2	<i>Avaliação da especificidade do efeito da acupuntura em diferentes acupontos na nocicepção induzida pela formalina.....</i>	<i>81</i>
4.4.1.5	Avaliação do tratamento com acupuntura no acuponto SP6 na neuropatia induzida pela Ligadura Parcial do Nervo Ciático.....	82
4.4.1.6	Avaliação da hipersensibilidade mecânica após LPNC e tratamento com acupuntura manual no SP6.....	84
4.4.1.7	Avaliação da hipersensibilidade térmica ao calor após LPNC e tratamento com acupuntura manual no SP6.....	85
4.4.1.8	Avaliação da hipersensibilidade térmica ao frio após LPNC e tratamento com acupuntura manual no SP6.....	87
4.4.2	Resultados.....	88
4.4.2.1	Padronização da acupuntura manual no acuponto SP6.....	88
4.4.2.1.1	<i>Efeito do pré-tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 sobre o modelo de nocicepção induzido pelo ácido acético.....</i>	<i>88</i>

4.4.2.1.2	<i>Efeito do pré-tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 sobre o modelo de nocicepção induzida pela formalina.....</i>	<i>91</i>
4.4.2.2	Envolvimento de fibras nervosas periféricas na antinocicepção causada pelo tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6.....	92
4.4.2.3	Especificidade do efeito da acupuntura em diferentes acupontos em modelos de nocicepção aguda.....	94
4.4.2.4	Acupuntura no acuponto SP6 reduz hipersensibilidade mecânica em animais submetidos à LPNC (ligadura parcial do nervo ciático).....	97
4.4.2.5	Acupuntura no acuponto SP6 reduz hipersensibilidade térmica ao calor em animais submetidos à LPNC.....	98
4.5	PARTE II: ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO.....	101
4.5.1	Metodologia.....	101
4.5.1.1	Avaliação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos no efeito antinociceptivo da acupuntura realizada no acuponto SP6.....	101
4.5.1.1.1	<i>Participação de receptores opióides.....</i>	<i>102</i>
4.5.1.1.2	<i>Participação de receptores colinérgicos.....</i>	<i>103</i>
4.5.1.1.3	<i>Participação de receptor dopaminérgico.....</i>	<i>103</i>
4.5.1.1.4	<i>Participação de receptores serotoninérgicos.....</i>	<i>103</i>
4.5.1.1.5	<i>Participação de receptores adrenérgicos.....</i>	<i>104</i>
4.5.1.1.6	<i>Participação de receptores adenosinérgicos.....</i>	<i>104</i>
4.5.1.2	Análise imunoistoquímica da ativação da proteína c-Fos em animais tratados com acupuntura no acuponto SP6.....	105
4.5.2	Resultados.....	107
4.5.2.1	Envolvimento de sistemas endógenos no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6, na nocicepção induzida por ácido acético.....	107

4.5.2.1.1	<i>Envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6.....</i>	<i>107</i>
4.5.2.1.2	<i>Envolvimento do sistema colinérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6.....</i>	<i>109</i>
4.5.2.1.3	<i>Envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6.....</i>	<i>111</i>
4.5.2.1.4	<i>Envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6.....</i>	<i>112</i>
4.5.2.1.5	<i>O sistema serotoninérgico e o adrenérgico não estão envolvidos no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6.....</i>	<i>113</i>
4.5.2.2	Efeito da acupuntura manual no SP6 na ativação da proteína c-Fos em áreas encefálicas, em animais que não foram expostos a modelos de nociceção.....	116
4.6	PARTE III: EFEITO DA ACUPUNTURA NA PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA.....	117
4.6.1	Metodologia.....	117
4.6.1.1	Indução da peritonite.....	117
4.6.1.2	Contagem de leucócitos peritoneais.....	120
4.6.1.3	Permeabilidade capilar peritoneal.....	120
4.6.1.4	Ensaio de mieloperoxidase do líquido peritoneal.....	120
4.6.1.5	Determinação dos níveis de citocinas do líquido peritoneal..	121
4.6.1.6	Envolvimento das glândulas adrenais.....	121
4.6.2	Resultados.....	122
4.6.2.1	Efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 no modelo de peritonite induzida por carragenina.....	122

4.6.2.2	Acupuntura no SP6 não modifica níveis de TNF- α e IL-1 β porém, restabelece os níveis de IL-10 na peritonite induzida por carragenina.....	123
4.6.2.3	Participação dos glicocorticóides endógenos no efeito da acupuntura manual, realizada no acuponto SP6, na peritonite induzida por carragenina.....	126
4.7	PARTE IV: EFEITO DA ACUPUNTURA EM UM MODELO DE DOR MUSCULAR INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	130
4.7.1	Metodologia.....	130
4.7.1.1	Modelo de inflamação muscular induzido pela carragenina..	130
4.7.1.2	Avaliação da hipersensibilidade mecânica após indução da dor muscular e tratamento com acupuntura manual no SP6.....	129
4.7.1.3	Avaliação da hipersensibilidade mecânica pelo teste de força de preensão da pata após dor muscular e tratamento com acupuntura..	129
4.7.1.4	Avaliação da hipersensibilidade térmica ao calor após dor muscular e tratamento com o acuponto SP6.....	130
4.7.1.5	Determinação dos níveis de citocinas do músculo após a injeção de carragenina.....	131
4.7.1.6	Avaliação da sensibilidade mecânica no músculo após injeção de carragenina no gastrocnêmio e tratamento com o acuponto SP6.....	131
4.7.1.7	Avaliação do edema muscular após injeção de carragenina no músculo e tratamento com o acuponto SP6.....	132
4.7.1.8	Avaliação do paradigma fuga/esquiva após injeção de carragenina no músculo e tratamento com o acuponto SP6.....	132

4.7.1.9	Perfusão Transcardial, preparação da fatia de tecido e imunoistoquímica para macrófagos após injeção de carragenina no músculo e tratamento com o acuponto SP6.....	133
4.7.2	Resultados.....	135
4.7.2.1	Hipersensibilidade mecânica e térmica induzida pela carragenina e efeito da acupuntura no acuponto SP6.....	135
4.7.2.2	Efeito da acupuntura manual no SP6 nos níveis de citocina IL-10 no músculo gastrocnêmio após a injeção de carragenina em camundongos.....	137
4.7.2.3	Efeito da acupuntura manual no SP6 sobre a hipersensibilidade mecânica e edema induzidos pela carragenina em animais C57BL/6 e animais IL-10-/-.....	138
4.7.2.4	Efeito da acupuntura manual realizada no acuponto SP6 sobre a quantidade e o fenótipo de macrófagos presentes no músculo após injeção de carragenina.....	141
5	DISCUSSÃO.....	144
5.1	PARTE I: ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA ACUPUNTURA NO ACUPONTO SP6, ESPECIFICIDADE E MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS.....	144
5.1.1	Acupuntura manual no acuponto SP6 possui atividade antinociceptiva nos modelos de nocicepção aguda induzida por ácido acético e formalina.....	144
5.1.2	Efeito dos pontos de acupuntura sobre modelos de nocicepção é diferenciado, mostrando especificidade da acupuntura.....	149
5.1.3	Antinocicepção causada por acupuntura manual no acuponto SP6 depende da integridade de fibras aferentes.....	152

5.1.4	Acupuntura manual no acuponto SP6 possui atividade antinociceptiva no modelo de LPNC.....	153
5.2	PARTE II: ANTINOCICEPÇÃO CAUSADA POR ACUPUNTURA MANUAL NO SP6 DEPENDE DE NEUROTRANSMISSORES ENDÓGENOS E SEUS RECEPTORES E ATIVA ÁREAS ESPECÍFICAS NO ENCÉFALO.....	157
5.3	PARTE III: ACUPUNTURA REALIZADA NO ACUPONTO SP6 REDUZ INFLAMAÇÃO EM MODELO DE PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA POR AUMENTO DE CITOCINA ANTI-INFLAMATÓRIA IL-10 E CORTICÓIDES ENDÓGENOS.....	167
5.4	PARTE IV: ACUPONTO SP6 EXCERCE EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO EM ANIMAIS SUBMETIDOS À INFLAMAÇÃO MUSCULAR INDUZIDA POR CARRAGENINA POR AUMENTAR NÍVEIS DE CITOCINA IL-10 LIBERADOS POR MACRÓFAGOS DO TIPO M2.....	171
5	CONCLUSÃO.....	177
	REFERÊNCIAS.....	179

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR E NOCICEPÇÃO

Aristóteles (384-322 a.C.) considerou o coração como sede dos sentimentos e afirmava que a dor estava ligada à disposição do indivíduo. Assim, ele argumentou que a dor era uma emoção. Séculos mais tarde, Galeno (130-201 d.C.) reconheceu o cérebro como órgão responsável pelo sentimento e também pela dor, colocando a mesma na esfera das sensações. Com o passar do tempo, os pesquisadores questionavam se a dor resultava da atividade de um aparelho neural ou era o produto de processos específicos (para revisão ver PERL, 2007).

Atualmente, sabe-se que a dor resulta geralmente da sinalização de estímulos nocivos, que é iniciada em estruturas localizadas no sistema nervoso periférico (SNP) e conduzida até diferentes locais do sistema nervoso central (SNC), fazendo com que ocorra uma reação neurossensorial descrita como percepção ou sensação dolorosa (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM et al, 2009). Essa sensação dolorosa é, na verdade, um importante sistema de alerta que nos protege de perigos reais ou iminentes de lesões, acionando respostas de proteção ao organismo. Em condições normais, a dor serve para proteção e adaptação do nosso corpo (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; MILLIGAN; WATKINS, 2009).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (com a sigla em inglês - IASP) considera a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada ao dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão. Existe uma série de fatores constitucionais, situacionais, comportamentais e emocionais que influenciam a percepção da dor no ser humano e, por isso, um estímulo nocivo de mesma intensidade pode provocar reações distintas em diferentes indivíduos. A dor é um fenômeno subjetivo, mas tem um caráter sensorial ou fisiológico que é chamado de nocicepção (LOESER; TREEDE, 2008).

O estudo da dor em seres humanos é complexo devido à influência do estado afetivo (emocional) e cultural na forma como a dor e sua expressão são encaradas pelos indivíduos. Em animais de laboratório, estes fatores geralmente não são levados em consideração, sendo pouco influentes ou inexistentes nas avaliações atuais. No entanto, a dor que um animal é capaz de sentir pode envolver também muitos fatores

emocionais; contudo, até o momento conseguimos mensurar de forma relativamente precisa apenas os aspectos neurossensoriais da dor, avaliando nestes casos a nocicepção (para revisão ver RUSSO; BROSE, 1998; TJØLSEN; HOLE, 1997).

De acordo com a IASP, no protocolo realizado na cidade de Quioto em 2007, a nocicepção está presente em muitos estados de dor. Contudo, a dor pode ocorrer sem a nocicepção, ou ativação direta de nociceptores e vice versa. Segundo eles, deve-se verificar explicitamente a distinção entre nocicepção e dor para uma melhor compreensão entre os estudiosos, pesquisadores e clínicos, pois são eventos que podem ocorrer de forma independente (para revisão ver LOESER; TREEDE, 2008).

A nocicepção é o termo fisiológico usado para descrever os processos neurais de codificação e processamento do estímulo nocivo. O estímulo nocivo é um evento que pode causar dano tecidual de fato ou potencialmente, mas alguns tipos de danos teciduais podem não ser detectados por qualquer receptor sensorial e por isso não causam dor. Portanto, é importante levar em consideração a descrição de estímulo nociceptivo, considerado um evento real ou potencialmente causador de dano tecidual, e que é traduzido e decodificado por nociceptores (LOESER; TREEDE, 2008).

1.1.1 Circuitos neurais da nocicepção

Muitos pesquisadores não consideravam a dor um sentido específico, pois diferentes tipos de estímulos (mecânico, térmico e químico) eram capazes de evocar a dor. Sherrington (1906) sugeriu que a dor não era originada do tecido lesionado, e sim que a sinalização do evento nocivo (nocicepção) seria realizada por um órgão sensorial responsável pela dor especificamente (SHERRINGTON, 1906; PERL, 2007). Ele propôs a existência de um caminho neural, que mais tarde foi identificado como um neurônio sensorial primário, que seria ativado por um estímulo capaz de causar lesão tecidual, o qual foi denominado de “nociceptor” (SHERRINGTON, 1906; JULIUS; BASBAUM, 2001; PERL, 2007).

O nociceptor pode ser considerado a subpopulação de fibras nervosas periféricas que detectam estímulos químicos, mecânicos e térmicos intensos (BASBAUM; JESSELL, 2000; BASBAUM et al, 2009). Porém, atualmente, o nociceptor foi descrito como um receptor sensorial que é capaz de transduzir e decodificar um estímulo nocivo, e

para uma melhor compreensão, neste trabalho considerar-se-á esta definição (LOESER; TREEDE, 2008). Segundo a IASP em 2007, na verdade, o nociceptor é descrito como a terminação periférica do nervo sensorial (neurônio nociceptivo) que age como um receptor, transduzindo e decodificando o sinal nocivo em potencial de ação. A fibra nervosa aferente ao qual o nociceptor (terminação nervosa livre ou periférica) pertence e que em muitos trabalhos é chamada também de nociceptor, será aqui descrito como neurônio nociceptivo (para revisão ver LOESER; TREEDE, 2008).

Os neurônios nociceptivos são distintos de outras fibras nervosas sensoriais, porque eles detectam confiavelmente uma estimulação nociva de uma inócua, uma capacidade inexistente em neurônios aferentes não nociceptivos (BESSOU; PERL, 1969; JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM et al, 2009). Estudos eletrofisiológicos posteriores confirmaram a existência de neurônios sensoriais primários que podem ser excitados pelo calor nocivo, pressão intensa ou irritantes químicos, porém geralmente não são excitados por estímulos inócuos. Portanto, a dor pode ser caracterizada como uma submodalidade sensorial somestésica similar ao toque, pressão e propriocepção, na qual um estímulo de certa qualidade ou intensidade é detectado por células especializadas (GREER; HOYT, 1990; JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os aspectos que envolvem a neurofisiologia da dor podem ser divididos didaticamente em quatro processos distintos: transdução, transmissão, modulação e percepção, como pode ser observado na Figura 1 (KELLY et al, 2001).

(1) Transdução: essa etapa se refere à decodificação de estímulo mecânico, térmico e químico nocivos em impulsos elétricos pelas terminações nervosas especializadas. Essas terminações correspondem à região sensorial da fibra nociceptiva (nociceptores), presentes na extremidade periférica do neurônio nociceptivo. Assim, os nociceptores são parte dessa fibra nociceptiva, diferentemente de outros receptores, como os mecanorreceptores, que não são parte da fibra mecanossensível, mas estão ligados a ela. As terminações livres são encontradas na pele, mucosas, fáscias, tecido conjuntivo de órgãos viscerais, ligamentos, cápsulas articulares, periósteo, músculos, tendões e vasos arteriais (MILLAN, 1999, LOESER; TREEDE, 2008). Elas são excitadas apenas por estímulos intensos, sugerindo que tenham propriedades biofísicas e moleculares que as permitam detectar seletivamente estímulos nocivos. Os nociceptores possuem canais iônicos como TRP (receptores de potencial transiente, ou, do inglês, Transient receptor potential), canais de sódio como os sensíveis a tetrodotoxina e receptores acoplados a proteína G, que transduzem a energia do estímulo nocivo térmico, mecânico ou químico, em potenciais de ação para o axônio que conduz os estímulos até a medula espinal (WOOLF; MA, 2007; MEYER et al, 2008).

(2) Transmissão: refere-se à propagação do impulso elétrico do sistema nervoso periférico até o sistema nervoso central. A transmissão tem início nos axônios dos neurônios nociceptivos. Assim, um estímulo essencialmente nocivo é capaz de estimular um nociceptor que transduz e decodifica o sinal gerando potencial de ação que percorre pela fibra nociceptiva. Essas fibras são classificadas de acordo com suas características anatômicas, velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM et al, 2009).

As fibras de pequeno diâmetro são as que originam a maioria dos nociceptores. Neste grupo, encontram-se as fibras do tipo C e do tipo Aδ, que são responsáveis pela transmissão do estímulo nociceptivo sob condições fisiológicas. As fibras Aδ são pouco mielinizadas, conduzem o impulso elétrico em uma velocidade entre 12 e 30 m/s e são responsáveis pela chamada “primeira dor”. Elas podem ser divididas em duas classes principais: (1) Tipo I: que responde a estímulo nocivo mecânico e químico e a temperaturas acima de 50°C (se o calor é mantido elas passam a responder ao calor menos intenso) e são sensibilizadas no tecido lesionado; (2) Tipo II: tem baixo limiar de resposta ao calor e alto limiar mecânico (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001).

As fibras C conduzem o estímulo a uma velocidade em torno de 0,5 a 2 m/s (mais lento que as fibras do tipo A δ) porque não possuem bainha de mielina e são responsáveis pela chamada “segunda dor”, uma dor mais difusa e demorada. Elas são em sua maioria conhecidas como fibras polimodais, por transmitirem estímulos mecânicos, térmicos e químicos (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001). A maior parte das fibras C também responde a estímulos químicos nocivos como ácido ou capsaicina, que é o componente ativo das pimentas conhecidas internacionalmente como pimentas chili, que são plantas que pertencem ao gênero *Capsicum* (CATARINA et al, 1997). A capsaicina tem a habilidade de destruir seletivamente os neurônios não mielinizados do gânglio da raiz dorsal (GRD) em animais em desenvolvimento, tornando-se uma ferramenta útil no estudo da nocicepção (SNIDER; MACMAHON, 1998). Existem ainda fibras nociceptivas silenciosas (“silent” ou “sleeping”), que compreendem uma proporção das fibras aferentes, que normalmente não são responsivos a estímulos. No entanto, quando influenciados por mediadores inflamatórios (Figura 2), apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizadas e responsivas (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM et al, 2009).

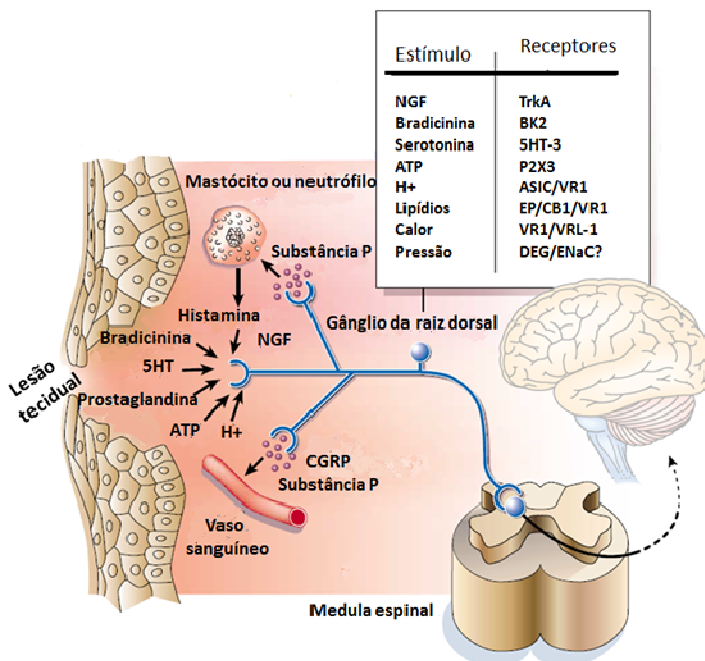
As fibras nociceptivas do tipo C também podem ser classificadas em dois grandes grupos: (1) o primeiro é o grupo chamado de peptidérgica, que expressam os neurotransmissores peptídicos substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), e também os receptores de tirosina quinase A (TrKA), que possuem alta afinidade ao fator de crescimento do nervo (NGF); (2) O segundo grupo de fibras C, ou fibras C não peptidérgicas, expressam o receptor P2X3, um subtipo de canal iônico sensível ao ATP. Além disso, envia suas terminações nervosas quase que exclusivamente para a lâmina II, que juntamente com a lâmina III, constituem a região chamada substância gelatinosa (BESSON, 1999; HUNT; MANTYH, 2001; JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM et al, 2009). As fibras sensoriais podem responder a diferentes estímulos e estão presentes na cabeça e no corpo, tendo seus corpos celulares no gânglio trigeminal ou no GRD, respectivamente. Os neurônios aferentes primários nociceptivos do corpo têm então seus corpos celulares localizados no GRD, e são chamados de neurônios pseudo-unipolares, porque emitem projeções axonais em duas direções: tanto para a periferia quanto para a medula espinal (BESSON, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001). Os impulsos nervosos chegam através dos aferentes primários à substância cinzenta da medula espinal, especificamente no corno dorsal. As fibras nociceptivas penetram perpendicularmente em camadas mais

superficiais do corno dorsal (lâmina I e II) ou se estendem até camadas mais profundas (lâmina V, VI, VII e X) (CALVINO; GRILO, 2006).

A informação nociceptiva é transmitida do corno dorsal para estruturas supraespinais através de neurônios de segunda ordem, que constituem as vias ascendentes e fazem sinapse com os neurônios aferentes primários. Os neurônios de segunda ordem e também interneurônios localizados no corno dorsal da medula espinal são ativados pela liberação de neurotransmissores (como glutamato {Glu} e SP) dos aferentes primários, e este processo também é mediado por canais de cálcio e sódio (BESSON, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; MILLIGAN; WATKINS, 2009). Grande parte dos axônios dos neurônios de segunda ordem decussam no nível do segmento espinal, e conseqüentemente, as projeções supraespinais são contralaterais ao estímulo. Poucos axônios falham em decussar e se projetam ipsilateralmente às estruturas supraespinais (CALVINO; GRILO, 2006; D'MELLO; DICKENSON, 2008).

Dentre as vias ascendentes (espinotalâmica, espinoreticular, espinomesencefálica, cervicotálamica e espinohipotalâmica), a via espinotalâmica é a mais proeminente na propagação do estímulo nociceptivo. Os neurônios de segunda ordem desta via emitem suas projeções diretamente ao tálamo ventroposterolateral. As áreas do tálamo são responsáveis pela sensação de toque e nocicepção, onde a informação é inicialmente processada (JULIUS; BASBAUM, 2001; CALVINO; GRILO, 2006; D'MELLO; DICKENSON, 2008). As fibras da via espinoreticulotalâmica se projetam para vários locais do tronco encefálico, como o núcleo paragigantocelular e bulbo rostral, como a substância cinzenta periaquedutal (PAG), além de áreas não específicas do tálamo. Locais como o hipotálamo recebem projeções de diferentes vias, em especial o núcleo parvocelular, entre outros. Ele está envolvido no controle da resposta autonômica do sistema nervoso à dor. Além disso, estruturas do sistema límbico estão envolvidas na resposta emocional e afetiva à dor, como diferentes áreas da amígdala e do hipocampo (BESSON, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; CALVINO; GRILO, 2006; PERL, 2011). Posteriormente, o estímulo é transmitido do tálamo até o córtex sensorial primário por neurônios de terceira ordem (BESSON, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM et al, 2009) (Figura 1).

Figura 2 – A complexidade molecular do neurônio aferente primário nociceptivo com liberação de mediadores inflamatórios no local da lesão tecidual.



Alguns dos principais componentes da "sopa inflamatória" estão ilustrados, incluindo peptídeos (bradicinina), lipídios (prostaglandinas), neurotransmissores (serotonina [5-HT] e ATP) e neurotrofinas (NGF). A natureza ácida da sopa inflamatória está indicada pela presença de H⁺ (hidrogênio). Cada um desses fatores sensibiliza ou excita o nociceptor por interação com receptores de superfície celular expressos nos neurônios aferentes primários. Exemplos desses fatores e receptores são indicados na caixa. A ativação do nociceptor não só transmite a mensagem aferente para o corno dorsal da medula espinal (e daí para o cérebro), mas também inicia o processo de inflamação neurogênica. Esta é uma função retrógrada do neurônio sensorial em que há liberação de neurotransmissores, particularmente a SP e o CGRP, a partir do terminal periférico. Eles induzem a vasodilatação e extravasamento plasmático, bem como a ativação de muitas células não neuronais, incluindo mastócitos e neutrófilos. Estas células, por sua vez, contribuem adicionalmente na sopa inflamatória.

Fonte: Adaptado de Julius e Basbaum, 2001.

(3) Modulação: nesta etapa ocorrem modificações da propagação do estímulo nociceptivo através de mecanismos endógenos, em especial pela liberação de neurotransmissores. É mediada por interação entre neurônios medulares e impulsos das vias descendentes originadas no tronco encefálico e encéfalo. Esta interação ocorre através da participação de vários sistemas de neurotransmissores endógenos, como opioideérgico, serotoninérgico, noradrenérgico, colinérgico, adrenérgico, adenosinérgico, gabaérgico e glutamatérgico (MILLAN, 2002). A informação do estímulo nocivo é levada por sinais químicos bem caracterizados, como por exemplo, a SP liberada por neurônios aferentes pré-sinápticos que se liga ao receptor de neurocinina 1 localizado em neurônios pós-sinápticos. A coexpressão de receptores ionotrópicos para glutamato, que agem como canais de cátions, AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) e NMDA (N-metil-D-aspartato), ajudam a regular a liberação de alguns neurotransmissores e neuromoduladores, como a própria SP, o CGRP, a galanina, a somatostatina, entre outros, que são cruciais na realização das sinapses no corno dorsal da medula espinal (D'MELLO; DICKENSON, 2008; MILLIGAN; WATKINS, 2009).

O organismo possui mecanismos intrínsecos de controle da dor, pois após a estimulação dos diferentes núcleos do tálamo, os sinais podem ser transmitidos para vários locais do córtex sensorial somático, PAG, hipotálamo, amígdala e cerebelo. Um circuito modulador endógeno descendente (via de controle descendente inibitório da dor) envolvendo a PAG, o locus coeruleus e o bulbo rostral, é responsável pela liberação de neurotransmissores no corno dorsal da medula espinal (com a participação principalmente de serotonina e noradrenalina) que conseguem promover inibição da informação nociceptiva. Assim, cada lesão induz um tipo diferente de resposta devido à plasticidade do sistema nervoso. Os sistemas de neurotransmissão mais estudados no caso especialmente de inibição, mas também de facilitação da nocicepção são: glutamatérgico, gabaérgico, neuropeptidérgico, serotoninérgico, opioideérgico, adrenérgico, colinérgico entre outros (MILLAN, 1999; MILLAN, 2002; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004; JONES; DUNLOP, 2007).

(4) Percepção: é a etapa final do processo de sinalização nociceptiva realizada no encéfalo, e se refere à experiência física e emocional provocada pelo estímulo nociceptivo. Diferentes grupos funcionais de neurônios encefálicos, das áreas já citadas anteriormente, recebem a sinalização da via nociceptiva. As áreas do córtex

somatosensorial primário e secundário e córtex associativo, como o córtex parietal, estão envolvidos na gênese da percepção da dor como qualidade, localização, intensidade e duração. Os neurônios do tálamo projetam axônios para outras áreas do córtex envolvidas na resposta emocional à dor como o córtex frontal, insular, e cingulado anterior, além de projeções para áreas motoras. Eles definem a percepção das características somáticas do estímulo e são responsáveis pelos aspectos cognitivos e afetivos da sensação de dor (CALVINO; GRILO, 2006; TRACEY; MANTYH, 2007).

A complexidade da dor levou alguns autores a classificarem ela por sua origem e tempo de duração. Quanto à origem, a dor pode ser considerada: dor nociceptiva, pela ativação excessiva de nociceptores; dor neurogênica, quando o tecido neuronal é lesionado e libera peptídeos que induzem a dor; dor neuropática, quando ocorre lesão ou alterações funcionais de um ou mais nervos; e dor psicogênica, quando não existe um fator somático identificável (MILLAN, 1999). Atualmente considera-se a melhor classificação pelo fator tempo, assim, a dor pode ser denominada de dor aguda ou crônica. A dor aguda ocorre pela ativação direta dos nociceptores após um estímulo que pode causar lesão ou apenas ativam o nociceptor sem consequências teciduais. Ou seja, a dor aguda ocorre quando estímulos específicos (químico, calor intenso ou pressão) que evocam uma resposta de nociceptores e induzem impulsos elétricos que são conduzidos pelo terminal da fibra nociceptiva através de seus axônios até o corno dorsal da medula espinal. Esse tipo de dor é transiente e geralmente desaparece após a eliminação do estímulo que a iniciou. Não obstante, a dor que perdura além de semanas, por meses (mais de três meses) ou anos, torna-se do tipo crônica, e pode acontecer em casos de infecção ou inflamação. A dor crônica, pode inclusive permanecer no indivíduo mesmo após a cura ou recuperação tecidual da lesão que induziu a dor inicialmente. As condições de dor são mediadas por conhecidos caminhos multisinápticos, que levam a informação da periferia até diversos locais do SNC. Em dores crônicas, esse processo apresenta diversas alterações (LONG et al, 1996; MILLAN, 1999; MILLIGAN; WATKINS, 2009).

1.1.2 Dor crônica

Em 2003, a população de brasileiros com 60 anos ou mais era de cerca de 17 milhões de pessoas, e em 2006, 19 milhões de pessoas, evidenciando o acelerado processo de envelhecimento da sociedade brasileira. A expectativa média de vida dos brasileiros se ampliou de tal forma que grande parte da população atual irá envelhecer. Com isso, aumentará o custo no tratamento e alívio dos sintomas das doenças crônicas comumente encontradas na população idosa. Em 2003, 29,9% da população brasileira reportou ser portadora de, pelo menos, uma doença crônica; entre os indivíduos de 0 a 14 anos, 9,3% apresentam doenças crônicas, e entre os idosos a incidência atinge 75,5% do grupo (VERAS; PARAHYBA, 2007).

A dor é um importante problema de saúde associado às doenças crônicas, além do uso extensivo dos serviços de saúde pelos pacientes, com altos custos orçamentários. Apesar da elevada prevalência e impacto negativo da dor crônica, seu tratamento médico tem sido negligenciado por muitas razões. A tendência é preocupar-se com a dor crônica como um sintoma de uma doença; assim, a abordagem no seu tratamento é de um cuidado agudo, ao invés de um tratamento adequado. Numerosos estudos mostraram que o manejo clínico de várias condições de dor crônica permanece insatisfatório (DOBKIN; BOOTHROYD, 2008).

Além da dor crônica, a dor aguda também é um problema de saúde, que atualmente não é tratada de forma adequada e que pode evoluir para dor crônica. A dor aguda foi definida como uma resposta fisiológica previsível aos estímulos, caracterizada por duração autolimitada e reversão completa com a interrupção do estímulo nociceptivo. Apesar do conhecimento de que o tratamento adequado da dor aguda melhora a qualidade de vida do paciente, reduz a chance de evolução para dor crônica, gera satisfação com o atendimento de saúde e reduz os custos com internação (SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA DOR, 2010; VOSCOPOULOS; LEMA, 2010). Algumas barreiras atualmente fazem com que a dor aguda não seja adequadamente tratada, entre elas, destacam-se: (1) o fato de o profissional que não consegue avaliar a presença da dor, assim como realizar o correto alívio; (2) o paciente acredita que a dor aguda não é prejudicial; (3) o pouco dinheiro despendido pelo sistema de saúde

pública (SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA DOR, 2010).

O processo de sinalização da dor aguda, desde as projeções das fibras nociceptivas até as áreas centrais e as sinapses realizadas pelos neurônios que levam a informação dolorosa, envolvem diversos tipos de neurotransmissores, neuromoduladores e seus receptores. Neste caso, identifica-se a doença ou lesão tecidual, e considera-se esse tipo de dor como um alarme para proteção do organismo. Contudo, a dor que dura por mais de três meses é, por si só, uma condição de doença (MILLIGAN; WATKINS, 2009).

Quando a lesão ou inflamação é prolongada, ela pode provocar dor crônica. Um tecido neural lesionado ou inflamado também pode sensibilizar neurônios da medula espinal, provocando dor crônica. As mudanças químicas e neurais encontradas em casos de dores crônicas ocorrem no local da lesão ou nas terminações nervosas de fibras nociceptivas, nos neurônios de primeira ordem e medulares e/ou em áreas supraespinais. As mudanças neuronais e bioquímicas que ocorrem de condições normais de dor para um estado facilitatório no corno dorsal da medula espinal são conhecidas como "sensibilização central" (WOOLF; SALTER, 2000). A sensibilização central contribui para uma hipersensibilidade persistente à dor em situações patológicas que envolvem inflamação e dano no sistema nervoso. Os mecanismos moleculares e celulares envolvidos incluem a contribuição de receptores glutamatérgicos, que podem ser do tipo ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato), assim como receptores glutamatérgicos do tipo metabotrópicos (grupo I, II e III – mGluR). Outros mecanismos incluem o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a SP, o CGRP e a bradicinina, que podem participar do desenvolvimento da sensibilização central e hipersensibilidade à dor em modelos de dor inflamatória e neuropática (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009). Os fatores periféricos constituem uma espécie de “sopa inflamatória” que pode sensibilizar os terminais nervosos (MCMAHON; CAFFERTY; MARCHAND, 2005), e a atividade alterada de neurônios da medula espinal e/ou encéfalo podem levar a dor crônica do tipo neuropática. A dor neuropática é frequentemente associada ao trauma direto e/ou inflamação de nervos periféricos (NAVARRO; VIVO; VALERO-CABRE, 2007; BARON, 2006). Ela é desencadeada como consequência direta de lesão ou doença afetando o sistema somatosensorial (LOESER; TREEDE, 2008).

Frequentemente encontrada na clínica, a dor neuropática tem sintomas como dor espontânea ou hipersensibilidade da área afetada,

podendo ser incapacitante e intermitente (FINNERUP; JENSEN, 2004). A dor de origem neuropática é relativamente comum, com incidência de aproximadamente 1 a 3% da população mundial (DWORKIN et al, 2003; IRVING, 2005). Ela acompanha uma grande quantidade de doenças como: diabetes, herpes-zóster, lesão medular, acidente vascular encefálico, entre outras (CODERRE et al, 1993; WOOLF; SALTER, 2000; JI; WOOLF, 2001; BOUHASSIRA et al, 2008). A dor neuropática acompanha em geral uma neuropatia periférica, doença neuromuscular comum, desencadeada por trauma ou lesão, ou ainda por alguma condição patológica que afeta os nervos, causando deficiências sensorio-motoras e alterações funcionais (VALLAT; MAGY, 2005). As neuropatias podem ser resultantes de doenças sistêmicas, como diabetes, SIDA (Síndrome da imunodeficiência adquirida), deficiências nutricionais e doenças vasculares (aterosclerose) ou podem também ser desencadeadas por traumas agudos (PARKER, 2002). As neuropatias estão entre os problemas neurológicos mais comuns; contudo, poucas terapias e intervenções estão disponíveis para impedir ou reverter os danos e as sintomatologias associados a elas (ZOCHODNE, 2008).

O dano ao SNP pode levar à alodínia, que é uma resposta dolorosa a um estímulo não nocivo e também ao aumento da sensibilidade a um estímulo nocivo, chamado de hiperalgesia (NAVARRO; VIVO; VALERO-CABRE, 2007; LOESER; TREEDE, 2008). Em algumas situações, a dor neuropática pode se estender além dos limites dos nervos lesionados e pode manifestar-se bilateralmente, sugerindo alterações nos mecanismos centrais de processamento da informação nociceptiva (CODERRE et al, 1993).

Descreve-se uma sequência de eventos que podem acontecer no nervo após a indução da lesão: (1) produção imediata de disparos nervosos ocasionados pela lesão, que podem se prolongar por um tempo; (2) liberação de neuropeptídeos e mediadores pró-inflamatórios no local da lesão bem como no SNC; (3) sensibilização de nociceptores e fibras nociceptivas, e ativação de fibras silenciosas através da liberação de mediadores inflamatórios ou expressão de novos receptores ou canais iônicos; (4) mudanças na expressão gênica e na expressão de diversos peptídeos e receptores; (5) crescimento anormal de fibras periféricas e centrais; (6) mudanças nos campos receptivos e modalidades sensoriais de fibras periféricas lesionadas e intactas (SAADE; JABBUR, 2008).

Dentre as fibras periféricas aferentes, as fibras grossas mielinizadas ($A\alpha$ e $A\beta$) conduzem o estímulo de forma mais rápida do

que as fibras A δ e as fibras C (MILLIGAN; WATKINS, 2009). As fibras grossas do tipo A β respondem a estímulos não nocivos como vibração ou toque leve. Essa resposta pode ser altamente modificada durante ou depois do desenvolvimento de lesões, levando às sinalizações anormais do processo doloroso, como a resposta da fibra A β sendo percebida como dor (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Um dos mecanismos que pode contribuir para a sintomatologia da dor neuropática está relacionado à perda de neurônios, principalmente as fibras do tipo C, devido a sua compressão. Com isso, as fibras A β , que normalmente terminam na lâmina III do corno dorsal, passam então a brotar para as lâminas mais superficiais da medula (I e II), ocupando os espaços anteriormente ocupados pelas terminações centrais das fibras C. Deste modo, são formadas novas sinapses entre fibras A β e neurônios nociceptivos de segunda ordem que normalmente respondem a estímulos nocivos (WOOLF et al, 1995; LEKAN et al, 1996; TANDRUP et al, 2000).

Outra alteração que pode levar principalmente ao aparecimento de hiperalgesia ocorre por uma estimulação repetitiva sobre as fibras do tipo C, o que resulta em uma prolongada descarga no corno dorsal da medula espinal, conhecido como “wind up” (DAVIES; LODGE, 1987; HERRERO; LAIRD; LOPES-GARCIA, 2000). Esse fenômeno é um aumento progressivo no número de potenciais de ação por estímulo que ocorre em neurônios do corno dorsal; repetidamente, eles podem levar à potenciação de longo prazo (Long-Term Potentiation, LTP), que envolve um aumento prolongado na transmissão sináptica (POCKETT, 1995). Um dos fatores que levam ao “wind up” é o aumento na expressão de canais de sódio resistentes a tetrodotoxina, e diminuição na expressão de canais de potássio após a lesão do nervo (WAXMAN et al, 1999; BARON, 2006).

Na medula espinal, podem ocorrer mudanças nos campos receptivos das áreas periféricas no corno dorsal, acompanhados por diminuição da inibição pré-sináptica. Ademais, a lesão de neurônios sensoriais pode desencadear uma cascata de eventos no segmento correspondente da coluna vertebral ou núcleo do trigêmeo, que começa instantaneamente e perdura por períodos de tempo variáveis, dependendo do tipo, extensão e reversibilidade do dano. As mudanças na expressão fenotípica e síntese de neurotransmissores e neuropeptídeos acontecem nesse caso (SAADE; JABBUR, 2008; KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009). Por ser uma condição crônica, a principal característica desta doença é a mudança plástica causada pela

alteração na expressão gênica de receptores, canais iônicos, proteínas intracelulares, neuromoduladores e mediadores de sinalização extracelular, entre outros (WOOLF; COSTIGAN, 1999; XIAO et al, 2002; COSTIGAN et al, 2002; JI; STRICHARTZ, 2004). Por exemplo, ocorre redução na liberação de GABA e receptores GABAérgicos; mudanças na localização e/ou expressão de receptores para a SP, para bradicinina, para opióides, para serotonina e ainda de transportadores de Glu. Estes fatores podem ser os responsáveis pelo desenvolvimento de dor espontânea, disestesia e hiperalgesia, e têm sido correlacionados ao aumento da atividade espontânea e sensibilização dos neurônios do corno dorsal observado após um trauma ou lesão dos tecidos periféricos e nervos (SAADE; JABBUR, 2008; KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009).

A dor neuropática periférica é induzida não apenas pelo dano físico direto aos neurônios aferentes e seus ramos axonais, mas também indiretamente por moléculas sintetizadas por células gliais e imunes durante a degeneração do nervo e da mielina, tais como: as citocinas TNF- α (fator de necrose tumoral α), IL (interleucina)-1 β , IL-6, IL-10, quimiocina MCP-1, bem como fatores neurotróficos, BDNF, GDNF (fator de crescimento derivado de células gliais), NGF e NT (neurotrofina)-3 (KLUSAKOVA; DUBOVY, 2009). Estas moléculas parecem estar envolvidas na iniciação de estados de dor neuropática. Além disso, citocinas e quimiocinas são capazes de influenciar diretamente a excitação dos neurônios aferentes e seus axônios (XIAO et al, 2002; SORKIN; YAKSH, 2009). Na presença de impulsos nocivos constantes, como na inflamação crônica ou no dano do nervo, a sensibilização central sustentada leva a alterações transcricionais em neurônios do corno dorsal que alteram suas funções por períodos prolongados. Os astrócitos, células gliais do SNC, respondem a esta atividade sináptica contínua através da mobilização interna de Ca²⁺, levando à liberação de Glu, ATP, que se liga ao P2X₃, TNF- α , IL-1 β , IL-6, óxido nítrico (NO) e prostaglandina E₂ (PGE₂). A microglia, considerada uma célula imune do SNC que age como um macrófago, pode ser ativada por vários fatores, como: quinases, quimiocinas e receptores como o Toll-like. A microglia é também uma fonte de vários fatores pró-inflamatórios, como espécies reativas de oxigênio, NO e citocinas, sendo essa célula uma das responsáveis pela manutenção do processo doloroso. As moléculas liberadas pelas células gliais podem ser fatores cruciais no tratamento da dor neuropática (WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001; INOUE; TSUDA, 2009).

Em grande parte dos casos clínicos, pacientes com dor neuropática são resistentes aos tratamentos farmacológicos, estando este tipo de dor entre as mais difíceis de tratar (DWORKIN et al, 2003; FINNERUP et al, 2005; ATTAL et al, 2010). Os pacientes com dor neuropática geralmente não respondem bem a anti-inflamatórios não-esteroidais e, muitas vezes, são resistentes ou insensíveis à opióides. Atualmente, o tratamento é realizado com a utilização de antidepressivos tricíclicos ou inibidores da recaptação de serotonina, anticonvulsivantes e capsaicina de uso tópico (creme ou pomada), dentre outros. Entretanto, estes fármacos apresentam limitada eficácia e/ou significativos efeitos adversos que comprometem sua utilização (BARON, 2009).

1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é uma resposta que é desencadeada por estímulos nocivos, tais como infecções e lesões teciduais para restabelecer a homeostasia. O processo inflamatório tende a ajudar na proteção do organismo, e atua na reparação tecidual após lesões (MEDZHITOV, 2008; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

O processo inflamatório é caracterizado por sinais cardinais descritos por Celsus (25 a.C. - 50 d.C.): rubor (hiperemia), tumor (edema), calor (aumento da temperatura local) e dor (GILROY et al, 2004). Ainda existe um quinto sinal inflamatório, que é a perda da função do tecido ou órgão lesado (KALISCH, 1975).

O dano tecidual leva à liberação de mediadores por neurônios aferentes primários ou por células não-neuronais que residem no local ou infiltram-se na área lesada, gerando a dor. Entre essas células estão mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos. Assim, as moléculas de sinalização liberadas por causa da lesão tecidual incluem serotonina, histamina, Glu, ATP, SP, adenosina, CGRP, bradicinina, eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos), endocanabinóides, NGF, TNF- α , IL-1 β , proteases extracelulares e prótons, entre outros, que originam a chamada "sopa inflamatória". Esses fatores atuam diretamente sobre o nociceptor por ligação a um ou mais receptores, como canais TRP, canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs), canais de potássio e receptores TrK (MEYER et al, 2005). A abordagem mais comum para reduzir a dor do tipo inflamatória envolve a inibição da síntese ou do acúmulo dos componentes da sopa inflamatória. A

segunda abordagem seria bloquear as ações dos agentes inflamatórios no nociceptor, evitando a sensibilização periférica (BASBAUM et al, 2009).

A lesão tecidual também promove a liberação de numerosas citocinas (proteínas de baixo peso molecular produzidas por diferentes tipos celulares do sistema imune) e entre elas, as mais importantes são IL-1 β , IL-6 e TNF- α (BASBAUM et al, 2009; RITTNER; MACHELSKA; STEIN, 2009). Embora exista discussão das evidências de uma ação direta dessas citocinas sobre os nociceptores, a contribuição delas para hipersensibilidade primária à dor resulta principalmente da potencialização da resposta inflamatória e aumento da produção de agentes pro-algésicos (como as prostaglandinas, o NGF, a bradicinina e prótons extracelulares). Além disso, sabe-se que a ativação principalmente de receptores TRP (TRPV1 – vanilóide e TRPA1 - anquirina) e ASICs, são importantes na ativação de nociceptores durante a inflamação, sendo eles responsáveis também por sintomas como alodínia e hiperalgesia (BASBAUM et al, 2009). Entretanto, as citocinas podem desempenhar um papel importante na geração e manutenção da dor evocada pela inflamação, pelo menos em parte, através dos efeitos diretos sobre seus receptores localizados em fibras aferentes primárias (SCHAIBLE et al, 2010).

A resposta inflamatória aguda básica provocada por infecção ou lesão tecidual envolve o extravasamento coordenado de componentes do sangue (plasma e leucócitos) para o local da infecção ou lesão (KUMAR; COTRAN; ROBLINS, 2003; MAYNO; JORIS, 2004; MEDZHITOV, 2008). O reconhecimento do agente nocivo é mediado por células residentes, como macrófagos e mastócitos, levando à produção e liberação por eles de mediadores inflamatórios, como citocinas inflamatórias. Além delas, eicosanóides, aminas vasoativas e produtos da cascata proteolítica, produtos da degranulação de mastócitos (histamina e serotonina), componentes do sistema complemento e óxido nítrico, mediadores peptídicos como cininas e CGRP, e mediadores lipídicos como prostaglandinas, também participam do processo inflamatório (MEDZHITOV, 2008; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

O principal e mais rápido efeito destes mediadores inflamatórios é o aumento do exsudato inflamatório (formação do edema), o qual resulta das seguintes alterações: aumento do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular e dilatação venular. Há aumento de proteínas plasmáticas localmente e influxo de granulócitos (leucócitos,

principalmente neutrófilos), seguido rapidamente por monócitos que se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas no local da lesão. As proteínas plasmáticas e os leucócitos são normalmente restritos aos vasos sanguíneos, mas neste caso elas atravessam as vênulas pós-capilares para os tecidos extravasculares no local da lesão (SERHAN; SAVILL, 2005; MEDZHITOV, 2008).

A vasodilatação é um fenômeno associado à inflamação, que facilita a disponibilidade de mediadores e células inflamatórias, ocorrendo minutos após uma lesão envolvendo arteríolas, vênulas e capilares, e promovendo um aumento do fluxo sanguíneo local. Esse processo é mediado por óxido nítrico e prostaglandinas (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Um fenômeno atribuído à vasodilatação e ao extravasamento plasmático que é muito importante na inflamação é o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório. As citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, entre muitas outras, são produzidas por vários tipos de células, especialmente por macrófagos e mastócitos. Elas têm vários papéis importantes na resposta inflamatória, incluindo a ativação do endotélio e de leucócitos e indução da resposta inflamatória durante a fase aguda. O endotélio dos vasos ativados permite o extravasamento seletivo de neutrófilos, evitando a saída de eritrócitos. Esta seletividade é conferida por selectinas, integrinas, e receptores de quimiocinas nos leucócitos. Os neutrófilos ativados chegam ao local da lesão pelo contato direto com agentes patogênicos ou através da ação de citocinas secretadas pelas células residentes no tecido (NATHAN, 2006; POBER; SESSA, 2007; MEDZHITOV, 2008).

O processo de recrutamento de neutrófilos compreende etapas como a marginalização, adesão ao endotélio e migração celular (Figura 3). Mais de 50% dos leucócitos presentes na circulação sanguínea são neutrófilos, sendo eles os primeiros e em maior número a chegarem ao foco inflamatório (MARSHALL et al, 2003). O processo de transmigração de neutrófilos ocorre por marginalização do neutrófilo, ou seja, o movimento do neutrófilo da região central do fluxo de sangue para a periferia do vaso; além disso, adesão do neutrófilo ao endotélio mediado por moléculas de adesão expressas na membrana celular (selectinas). Essas mesmas moléculas, além de integrinas, permitem o rolamento do neutrófilo sobre as células endoteliais. Os neutrófilos atravessam o endotélio, nas junções entre as células, sendo este processo é chamado de diapedese, ou atualmente chamado de quimiotaxia. Esse processo acontece porque moléculas quimioatraentes (mediadores como produtos de bactérias, componentes do complemento e citocinas

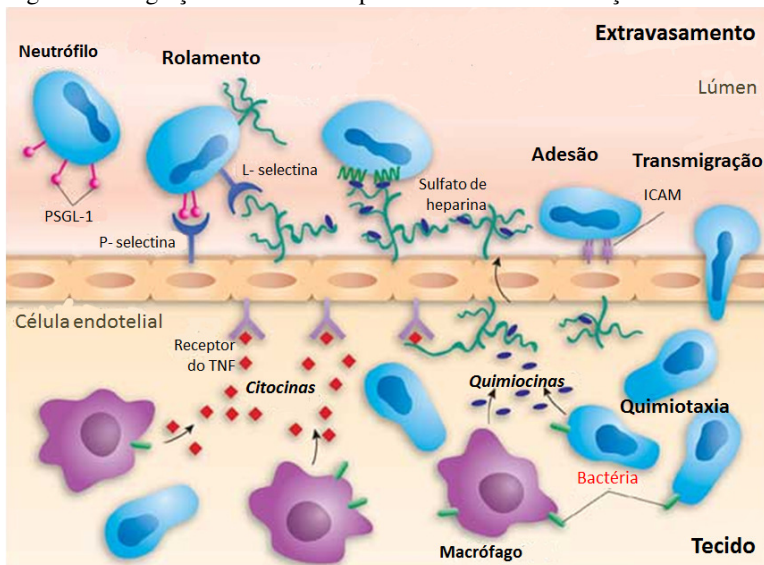
químioatraentes entre outros) facilitam a migração delas ao sítio inflamatório. As quimiocinas liberadas determinam subtipos celulares recrutados para o foco inflamatório (LUSTER, 1998; MARSHALL et al, 2003; KELLY et al, 2007).

Os neutrófilos tentam liquidar os agentes invasores, fagocitando e liberando conteúdo tóxico dos seus grânulos, que incluem espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio, proteinase 3, catepsina G e elastase (enzimas proteolíticas capazes de fazer a lise dos microorganismos). Contudo, estes potentes efetores não discriminam os agentes nocivos e as células locais não comprometidas, podendo assim causar danos aos tecidos íntegros locais (NATHAN, 2006; POBER; SESSA, 2007; MEDZHITOV, 2008). Após esses eventos, os neutrófilos entram em processo de apoptose. O sucesso da resolução da inflamação aguda resulta da resposta na eliminação dos agentes infecciosos, seguido por uma fase de resolução e de reparação, que é mediada principalmente por macrófagos residentes e recrutados. A mudança de mediadores inflamatórios para anti-inflamatórios é crucial para a resolução da inflamação. As lipoxinas inibem o recrutamento de neutrófilos e promovem recrutamento de monócitos, que removem células mortas e iniciam o remodelamento tecidual; resolvinas e protectinas também são importantes no remodelamento do tecido (SERHAN; SAVILL, 2005; MEDZHITOV, 2008).

Os monócitos presentes na corrente sanguínea são derivados de precursores da medula óssea, e são subdivididos em grupos que diferem no tamanho, tráfico pelo sangue, expressão de receptores imunes inatos e na sua capacidade de se diferenciarem após a estimulação por citocinas e/ou moléculas microbianas. Os monócitos estão envolvidos na defesa microbiana e implicados em muitas doenças inflamatórias, entre outras (SHI; PAMER, 2011). Os progenitores de monócitos podem ser vistos em órgãos como o baço, que serve de reservatório para monócitos imaturos, poucos dias após uma lesão ou invasão de microorganismos, quando liberados na circulação podem ser precursores de macrófagos. Quando ocorre um estímulo inflamatório, os monócitos presentes na circulação migram para os tecidos e se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas. Assim, o primeiro papel dos monócitos é ocupar o espaço do local da lesão com macrófagos residentes e células dendríticas, que serão ativados em resposta à inflamação. Os monócitos, macrófagos e células dendríticas, bem como os neutrófilos e mastócitos, são células fagocíticas especializadas. Dentro do total de fagócitos mononucleares, os macrófagos se distinguem das células dendríticas

pela expressão de marcadores como o F4/80, um importante marcador de macrófago em camundongos, CD11b e CD18 (também chamadas MAC1), CD68 e receptor Fc (proteína encontrada na superfície de algumas células imunes com função protetora), que também são usados como marcadores para identificar os diferentes tipos de macrófagos (MURRAY; WYNN, 2011; LAWRENCE; NATOLI, 2011).

Figura 3 – Migração de leucócitos para os locais da inflamação.



A inflamação causa marginação dos neutrófilos, facilitando as interações entre as células endoteliais vasculares e os neutrófilos. Essas interações são mediadas por selectinas e seus ligantes, que promovem o rolamento do neutrófilo. Essa adesão ainda é potencializada pela ação de integrinas e moléculas de adesão intercelular (ICAM). Os neutrófilos migram para o foco da lesão por ação de moléculas quimioatraentes e produtos bacterianos. Algumas substâncias, como o sulfato de heparina, são descritas como tendo um papel importante na ligação da selectina, na apresentação das quimiocinas aos receptores de quimiocinas nos neutrófilos e no transporte de quimiocinas, produzidas por macrófagos teciduais e também por neutrófilos. PSGL - P-selectina glicoproteína ligando-1.

Fonte: Adaptado de Parish, 2005.

O sistema fagocitário mononuclear é definido com base na sua origem e atividade fagocítica, e inclui os monócitos do sangue e seus derivados, macrófagos e células dendríticas. Há uma grande diversidade dentro de cada uma destas subpopulações (funcional e fenotípica). Os

macrófagos são divididos de acordo com sua localização anatômica e fenótipo. Alguns tecidos possuem macrófagos especializados, como: osteoclastos (osso), macrófagos alveolares (pulmão), microglia (cérebro), entre outros. Vários macrófagos são distintos por suas funções, em especial em dois casos: (1) macrófagos clássicos do tipo M1, que medeiam a defesa contra uma variedade de bactérias, protozoários e vírus, e têm um papel na imunidade antitumoral; (2) macrófagos alternativos ou regulatórios do tipo M2, que tem funções anti-inflamatórias e regulam a cicatrização de feridas. A nomenclatura M1/M2 é derivada das citocinas que estão associadas aos fenótipos dos macrófagos, e estão associadas às respostas imunes das células T helper (Th) 1 e Th2 (WYNN, 2004; MOSSER; EDWARDS; 2008; RICARDO; VAN GROOR; EDDY, 2008; XIAO et al, 2008; WYNN; BARROM, 2010; LAWRENCE; NATOLI, 2011; MURRAY; WYNN, 2011). Por exemplo, estímulos microbianos e interleucinas inflamatórias como IL-1 β podem levar a diferenciação da fenotipagem clássica M1, que secreta citocinas inflamatórias incluindo TNF- α ; enquanto citocinas Th2 como IL-4, IL-10 ou IL-13 induzem a diferenciação em macrófagos tipo M2, que produzem e liberam mediadores anti-inflamatórios como IL-10 e antagonista do receptor IL-1 β (MANTOVANI et al, 2004; GORDON, 2007; YAKEU et al, 2010).

Assim, dependendo do microambiente envolvido, os macrófagos podem adquirir fenótipos funcionais distintos. Entretanto, no geral, após uma lesão tecidual ou infecção, os macrófagos exibem geralmente um fenótipo inflamatório e secretam mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , NO e IL-1, que participam da ativação de vários mecanismos, incluindo processos antimicrobianos que contribuem para a morte dos invasores. Acredita-se que estes macrófagos do tipo M1 participem de diversas doenças crônicas. Como esses macrófagos possuem respostas inflamatórias e antimicrobianas importantes, eles devem ser controlados, para assim, evitar dano ao tecido íntegro. Ao contrário da atividade pró-inflamatória observada nos macrófagos do tipo M1, os macrófagos do tipo M2 exibem uma potente atividade anti-inflamatória. Eles antagonizam as respostas de M1, podendo ser cruciais para a manutenção da homeostasia após a lesão. Estudos atuais mostram que os macrófagos M1 podem, eles mesmos, converterem-se em anti-inflamatórios com fenótipo tipo M2 (ARNOLD et al, 2007; BISWAS; MANTOVANI, 2010; MURRAY; WYNN, 2011; LAWRENCE; NATOLI, 2011).

Os macrófagos com fenótipo tipo M2 são a maior fonte da citocina anti-inflamatória IL-10, que também é expressa por uma variedade de células, como células T, células B, células dendríticas e monócitos. Os macrófagos são estimulados a produzirem essas citocinas por vários fatores endógenos ou exógenos, como endotoxinas (via receptor Toll-like), TNF- α , catecolaminas e drogas que elevam AMPc (adenosina monofosfato cíclico, via proteína quinase) (PLATZER et al, 1995, 1999, 2000; MEISEL et al, 1996; WOICHIECHOWSKY et al, 1998; RIESE et al, 2000; ASADULLAH et al, 2003). Em particular, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo ativado pelo estresse) tem um papel importante na regulação da expressão de IL-10 in vivo. Quando ocorre o processo inflamatório no SNC (particularmente com liberação de IL-1 β seguido de trauma, neurocirurgia ou aumento da pressão craniana) ou indiretamente pela ativação do eixo do estresse por bactérias e toxinas, iniciam a liberação de catecolaminas que aumentam a produção de IL-10 por macrófagos, em especial no fígado (BARSIG et al, 1995; JILG et al, 1996; WOICHIECHOWSKY et al, 1998; ASADULLAH et al, 2003). A citocina anti-inflamatória IL-10 é crucial na prevenção de doenças inflamatórias e autoimunes. Neste sentido, a IL-10 tem funções diferentes em cada fase da resposta imune, e possivelmente em diferentes localizações anatômicas. A IL-10 foi inicialmente descrita como uma citocina do tipo Th2, mas evidências atuais sugerem que a produção de IL-10 esteja associada também a respostas celulares T reguladora (Treg), e sua expressão é mais ampla do que se sabe realmente. A IL-10 pode inibir o desenvolvimento da resposta Th1, mas também pode levar a supressão de células Th2 em respostas alérgicas (MOORE et al, 2001; HAWRYLOWICZ; O'GARRA, 2005; SARAIVA; O'GARRA, 2010). Ela pode apresentar um papel protetor importante em várias doenças, como aterosclerose, porque bloqueia a formação de macrófagos patogênicos do tipo M1 (PINDERSKI et al, 2002). A IL-10 pode inibir citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , bem como outros fatores inflamatórios, contribuindo para o a redução do processo inflamatório (VALE et al, 2003).

1.3 MODELOS ANIMAIS DE NOCICEPÇÃO E INFLAMAÇÃO

Experimentos sobre dor em humanos são um desafio por ser algo subjetivo e eticamente limitado; portanto, os modelos experimentais de dor com uso de animais de laboratório são amplamente utilizados

(MOGIL, 2009). Assim, os modelos experimentais em animais são ferramentas fundamentais que tornam possível o estudo da nocicepção e dor. Os aspectos sensoriais e discriminativos da dor dependem do processamento motivacional e aspectos afetivos da dor. Os diferentes tipos de dor tendem a ser diferentes também em seus cursos temporais: a dor nociceptiva e a inflamatória são geralmente de curto prazo, enquanto a dor neuropática, psicogênica ou ainda idiopática, muitas vezes, duram meses ou anos. A fisiopatologia da dor também parece depender do tecido afetado, por exemplo, se é cutânea, profunda (músculos e articulações) ou visceral. Uma enorme gama de testes experimentais de dor, de diferentes tipos, sobre estas dimensões e ainda outras continuam a serem desenvolvidos: testes agudos; inflamatórios; neuropáticos; doenças associadas à dor (MOGIL, 2009; BARROT, 2012). Assim, no presente trabalho, utilizaram-se modelos de nocicepção aguda, inflamatória e neuropática.

1.3.1 Modelos de nocicepção aguda

Os modelos clássicos envolvem o uso de um estímulo nocivo (que pode ser térmico, mecânico, elétrico ou químico) em uma parte do corpo (geralmente nas patas traseiras, na cauda ou no abdômen), levando à retirada defensiva da parte do corpo afetado, como resposta à dor, ou a outros comportamentos simples que podem ser mensurados de uma forma relativamente fácil (MOGIL, 2009; BARROT, 2012).

Como modelo de nocicepção aguda neste trabalho utilizou-se estímulos nocivos químicos. Entre os experimentos químicos agudos, o mais utilizado atualmente é o teste da formalina. Além dele, usam-se também testes de contorções abdominais com o uso de diferentes agentes irritantes, como ácido acético, entre outros (MOGIL, 2009; BARROT, 2012).

O modelo de nocicepção visceral (ácido acético) envolve a injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético em ratos ou camundongos, observam-se respostas que consistem em uma sequência de contorções do abdômen, acompanhadas de extensão de pelo menos um dos membros posteriores do animal, podendo também ser acompanhadas por torções do tronco, denominado de contorção abdominal (WHITTLE, 1964). Este teste é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral, e permite avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (KOSTER et al, 1959; TJØLSEN; HOLE, 1997).

Dentre as substâncias comumente utilizadas em injeções intradérmicas que induzem nocicepção, a formalina é uma das mais importantes (o teste da formalina). A formalina geralmente refere-se a uma solução de 37% de formaldeído (DUBUISSON; DENNIS, 1977; HUNSKAAR et al, 1985). A nocicepção induzida pela formalina permite a avaliação de dois tipos distintos de nocicepção, e pode ser considerado um modelo de inflamação de curto prazo. Neste teste, observamos uma fase inicial (1ª fase), caracterizada pela ativação dos aferentes primários (PUIG; SORKIN, 1996) e liberação de neurotransmissores excitatórios no corno dorsal da medula espinal (SKILLING et al, 1988), também chamada de fase neurogênica. Essa fase é seguida pela ativação de vias inibitórias descendentes, reduzindo o comportamento espontâneo de dor (fase quiescente). A 2ª fase é mediada tanto pela atividade de aferentes primários (SKILLING et al, 1988; TAYLOR et al, 1995; PUIG; SORKIN, 1996) como pelo aumento da sensibilidade espinal aos mediadores excitatórios que foram liberados (DICKENSON; SULLIVAN, 1987; CODERRE et al, 1990), também chamada de fase inflamatória (SWEITZER et al, 2004).

1.3.2 Modelos de inflamação e nocicepção crônica

O uso de agentes químicos para induzir um processo inflamatório não só é largamente utilizado para avaliar a nocicepção, mas também parâmetros inflamatórios (PAGANO et al, 2002; MOREAU et al, 2005; BARROT, 2012).

No modelo inflamatório induzido por carragenina intraperitoneal, é usada a carragenina como substância indutora de reação inflamatória local. Ela faz parte de uma família de polissacarídeos lineares sulfatados, obtidos a partir de extratos de algas marinhas vermelhas. Injeções de substâncias que ativam proenzimas e cininas, tais como a própria carragenina, induzem edema, com migração de células inflamatórias como neutrófilos, que atinge uma resposta máxima em cerca de 3-4 horas após a injeção (PAGANO et al, 2002; MOREAU et al, 2005).

Após danos teciduais, como em doenças autoimunes ou após exposição a agentes irritantes, o sistema imunológico libera mediadores inflamatórios que ativam e sensibilizam o sistema nociceptivo (MARCHAND et al, 2005). A maioria dos modelos de dor inflamatória ocorre por administração de substâncias que induzem uma resposta imune ou que são eles mesmos mediadores inflamatórios (NEGUS et al,

2006; BARROT, 2012). Agentes químicos como adjuvante completo de Freund (CFA), zimozam ou carragenina, causam um tipo de inflamação mais duradoura do que a inflamação gerada pela formalina, especialmente quando injetados em tecidos profundos como articulações, podendo causar alterações na cartilagem, sinóvia e osso (NEUGEBAUER et al, 2007; BARROT, 2012).

A carragenina pode induzir nocicepção quando injetada em outros locais como no modelo inflamatório induzido por carragenina intramuscular. As alterações que ocorrem após o insultos locais usando carragenina são provavelmente responsáveis pela sensibilização dos nociceptores periféricos e aferentes primários, os quais contribuem para o desenvolvimento de hiperalgesia secundária, em conjunto com as alterações centrais (RADHAKRISHNAN et al, 2003; MENSE, 1993; SCHAIBLE et al, 2002). Ela produz hiperalgesia cutânea, ou por sensibilizar nociceptores diretamente, ou por estimular a liberação de aminas simpáticas (CUNHA et al, 2005; LORAM et al, 2007). Pode ocorrer aumento na expressão de cicloxigenase e liberação de outras substâncias, na medula espinal, que podem ser responsáveis pela sensibilização central que ocorre na subaracnóidea após a indução da inflamação muscular provocada por carragenina (SCHAIBLE et al, 1987; DOUGHERTY; WILLIS, 1992; HOHEISEL; SANDER; MENSE, 1995; RADHAKRISHNAN; MOOREC; SLUKA, 2003).

Existem vários modelos de dores crônicas, contudo dentre os modelos utilizados para o estudo de dor neuropática, os mais utilizados são: (1) Constrição crônica do nervo ciático (CCC) que consiste na colocação de quatro suturas em torno do nervo ciático em intervalos de 1 mm; (2) Constrição ou ligação parcial do nervo ciático (CPNC ou LPNC), onde o nervo ciático é suturado (em torno de um terço de sua espessura). Este modelo é amplamente utilizado, pois produz sinais comportamentais de dor neuropática, porém poupa um número suficiente de fibras de modo que o membro inferior não apresenta grande prejuízo sensorial ou motor; (3) Lesão limitada do nervo (LLN), que consiste da secção dos nervos fibular e tibial posterior, sendo poupado o sural, onde provoca alterações comportamentais de longa duração; (4) Ligação de nervos espinais (LNE), que resulta da ligação dos nervos espinais (distal ao gânglio na raiz dorsal - L5 e L6), sendo poupado o nervo em L4, que produz lesão do nervo ciático, sem perda sensorial e atividades motoras (MCMAHON; KOLTZENBURG, 2006).

1.4 TRATAMENTO DA DOR COM ACUPUNTURA

Muitos pesquisadores buscam continuamente tratamentos que visam o alívio da dor, como analgésicos e anti-inflamatórios. Entre os tratamentos para aliviar esse sintoma, existe uma estratégia não farmacológica que é a acupuntura. Esta é usada há mais de 2000 anos para tratar a dor e várias outras doenças ou sintomas. Essa técnica milenar consiste na inserção de agulhas finas em locais específicos do corpo, chamados acupontos, localizados em tecidos profundos com rica inervação sensorial (NIH Consensus Conference, 1998; GOLDMAN et al, 2010; ZYLKA, 2010).

A acupuntura é uma técnica terapêutica empírica, baseada em tentativa e erro e que utiliza pensamento pré-científico. Ou seja, sua fundamentação é um raciocínio causal não científico. Pertence à Medicina Tradicional Chinesa – MTC, que engloba técnicas de massagem (Tui-Na), exercícios respiratórios (Chi-Gung), orientações nutricionais (ShuShieh) e a farmacopeia chinesa (medicamentos de origem animal, vegetal e mineral). O objetivo principal da MTC é a ideia de equilíbrio, tanto no que se refere às funções orgânicas quanto à relação do corpo com o meio externo. Ela preconiza que a saúde é dependente das funções psico-neuroendócrinas, sob influência de fatores genéticos e extrínsecos (nutrição, hábitos de vida, clima, qualidade do ambiente, entre outros) (SCOGNAMILLO-SZABÓ; BECHARA, 2010). A MTC baseia-se nas teorias do Yin-Yang e dos Cinco Elementos (LUNA, 2002; LIN, 2006; TAFFAREL; FREITAS, 2009), onde, segundo seus conceitos, Qi (por falta de melhor tradução pode ser considerado como energia) e Xue (sangue) fluem pelos órgãos e pelos meridianos ou canais de energia (LIN, 2006; POVOLNY, 2008; TAFFAREL; FREITAS, 2009). O livro “Clássico do Imperador Amarelo Sobre Medicina Interna”, escrito na Dinastia Han (206 a.C. a 220 d.C.) é, até os dias atuais, a base da MTC e traz informações sobre anatomia, fisiologia, patologia, diagnóstico e tratamento de doenças. Ele afirma que o sangue flui continuamente pelo corpo, sob controle do coração, cerca de 2.000 anos antes de Sir William Harvey propor sua teoria da circulação sanguínea em 1628 (CHAN et al, 1994; RISTOL, 1997; SCOGNAMILLO-SZABÓ; BECHARA, 2010).

O termo “acupuntura” deriva de duas palavras latinas, “acus” (agulha) e “pungere” (perfurar). Seu uso tem o intuito de afetar positivamente a condição clínica do paciente, melhorando sintomas, curando doenças, ou, mais de acordo com a concepção chinesa,

promovendo saúde (WANG; AUDETTE, 2008). A origem exata do uso da acupuntura na China é incerta; no entanto, sabe-se que foi um dos primeiros tratamentos utilizados na antiguidade. Com uso de agulhas feitas de pedra, pode ter sido usada na Idade da Pedra; com agulhas feitas de ossos, em séculos anteriores à Cristo na dinastia Xia, bem como agulhas de metal, num período posterior (FILSHIE; ZARNEGAR, 2005). A partir da China, a acupuntura se espalhou para mais de 160 países e regiões, tendo despertado grande interesse e aceitação no ocidente durante as últimas décadas (ZHAO, 2008).

Na década de 70, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendou a acupuntura para várias doenças, e atualmente aprova o uso da acupuntura para várias condições de saúde. A OMS publicou um artigo de revisão indicando a terapia com acupuntura para uma relação de mais de cem doenças, e, baseado em suas evidências, ela faz parte da medicina complementar, associada ou não a outras terapias (GOLDMAN et al, 2010; BONAFEDE et al, 2008). Em 1997, o National Institute of Health (NIH) dos Estados Unidos avaliou a literatura científica e opiniões de autoridades no assunto (NIH, 1997). Há atualmente um consenso que as provas da eficácia da acupuntura são suficientes para o tratamento de dor pós-operatória, bem como náusea e vômitos desencadeados por quimioterapia; pode ser útil na reabilitação de pacientes com AVE (acidente vascular encefálico), nas dores de cabeça, cólicas menstruais, epicondilites, fibromialgia, dor miofascial, osteoartrite, dores lombares, síndrome do túnel do carpo e asma. Desta forma, atualmente ela faz parte da prática convencional e não mais alternativa (NIH Consensus Conference, 1998; WANG; AUDETTE, 2008; ZHAO, 2008).

Contudo, ainda encontram-se na literatura numerosas contradições sobre os tratamentos com acupuntura, em especial em casos de dor (CHERKIN et al, 2009; ERNEST et al, 2011). Revisões sistemáticas mostram pouca evidência realmente convincente de que a acupuntura reduz de forma significativa a dor aguda e crônica (ERNEST et al, 2011). Segundo os autores, seus efeitos podem ser “não específicos” ou “placebo”. O efeito “não específico” se refere ao fato de não haver comprovação de efeitos individuais concretos dos pontos de acupuntura e entre os pontos de acupuntura e locais onde não existe acuponto. O efeito “placebo” se refere ao fato de o terapeuta poder persuadir o paciente ao resultado ou o próprio paciente poder se auto-induzir, pois procura a terapia acreditando previamente que ela é eficaz (CHERKIN et al, 2009; ERNEST et al, 2011). De acordo com o estudo,

uma agulha inserida em qualquer região do corpo pode ter consequência similar à acupuntura devido a esses efeitos “não específicos” ou “placebo” (ERNEST et al, 2011). Neste contexto, a acupuntura ainda é uma terapia vista com ceticismo por muitos profissionais da saúde, que não indicam ou não usam o tratamento com esta técnica (GOLDMAN et al, 2010).

Apesar de todas as controvérsias, um número expressivo de trabalhos, tanto clínicos quanto pré-clínicos, demonstram efeitos benéficos da acupuntura em várias condições dolorosas (NIH Consensus Conference, 1998; GOLDMAN et al, 2010; HAN, 2011). Muitos autores continuam na busca dos mecanismos pelos quais a acupuntura atua, levando em consideração que ela reduz efetivamente a dor e a inflamação (CHO et al, 2006; GOLDMAN et al, 2010; HAN, 2011). Os esforços na investigação da acupuntura e seus efeitos levaram ao aumento no número de estudos e revisões sistemáticas sobre o tema (WANG; AUDETTE, 2008). Atualmente, a acupuntura está sendo amplamente utilizada no ocidente para o tratamento de uma variedade de quadros patológicos, sendo, entretanto, mais reconhecida pelo seu efeito analgésico, especialmente no tratamento de dores crônicas, de difícil tratamento clínico (NIH Consensus Conference, 1998; SANTOS et al, 2009; GOLDMAN et al, 2010).

Os registros oficiais sobre a introdução da acupuntura no Brasil são raros, pois sua história se confunde com a chegada dos primeiros imigrantes chineses (1812), japoneses (1908), e outros povos orientais ao nosso país. A difusão da acupuntura na sociedade brasileira é incrementada na década de 1950 quando o fisioterapeuta Friedrich Johann Spaeth, nascido em Luxemburgo e naturalizado Brasileiro, funda a Sociedade Brasileira de Acupuntura e Medicina Oriental (1958). No ano de 1961 o fisioterapeuta Spaeth, juntamente com os médicos Ermelino Pugliesi e Ary Telles Cordeiro, funda o Instituto Brasileiro de acupuntura (IBRA), primeira clínica institucional de acupuntura do Brasil, e nesse mesmo ano chega ao país o médico oriental Wu Tou Kwang (FRÓIO, 2006). No Brasil os Conselhos Federais de Biomedicina, Enfermagem, Fisioterapia (resolução COFFITO-60, publicada no Diário Oficial da União nº 207, de 29 de outubro de 1985, Seção I), Farmácia, Medicina e Medicina Veterinária, entre outros, reconhecem a acupuntura como uma especialidade (WORLD FEDERATION OF ACUPUNCTURE AND MOXABUSTION SOCIETIES, 2006; SCOGNAMILLO-SZABÓ; BECHARA, 2010; SANTOS et al, 2009). O uso da acupuntura na clínica é de extrema

importância, pois é uma técnica com um custo relativamente baixo e com poucos efeitos adversos. Além de ser benéfica na redução da dor, a acupuntura alivia sintomas de várias doenças difíceis de serem tratadas com fármacos tipicamente usados na clínica (NIH Consensus Conference, 1998; GOLDMAN et al, 2010).

Não obstante, os próprios autores que estudam a acupuntura sugerem a continuidade das pesquisas, pois os trabalhos realizados com humanos geram muitas dúvidas devido ao efeito placebo, alterações emocionais, e outras variáveis que não podem ser excluídas ou mesmo padronizadas em humanos. Por outro lado, estudos realizados em animais podem divergir quanto aos achados, pois a variação de modelos experimentais e espécies animais modificam a resposta encontrada, em especial no estudo da dor crônica, visto que os mecanismos dessa condição diferem da dor aguda (CHO et al, 2006; ZHAO, 2008).

1.4.1 Como a acupuntura exerce seu efeito na dor

Na teoria dos Meridianos, referidos como canais (Jing) e seus ramos (Luo), é reconhecido que existem 361 pontos de acupuntura. Os meridianos são considerados um sistema de rede que ligam órgãos a superfície e possuem acupontos externamente que servem de via para “Qi” e “Xue”. Por essa teoria, a dor é atribuída a uma doença induzida pelo bloqueio dos meridianos. Portanto, quando o bloqueio é removido pela acupuntura, isso melhora a passagem de “Qi” e “Xue” nos meridianos e a dor é aliviada (ZHAO, 2008).

Quanto à base neurobiológica da acupuntura, ou seja, na visão ocidental, várias revisões mostram que os mecanismos pelos quais a acupuntura exerce seu efeito analgésico e anti-inflamatório tem uma base fisiológica, anatômica e neuroquímica bastante vasta (CHO et al, 2006; ZHAO, 2008). Os estudos mostram a participação de fibras sensoriais, vias espinais e centrais e muitas moléculas que podem ser liberadas a partir do estímulo com a agulha (para revisão ver ZHAO, 2008). Segue breve resumo sobre os mecanismos de ação da acupuntura até o momento (FILSHIE; ZARNEGAR, 2005).

Durante o agulhamento, com a manipulação da agulha, o paciente pode referir uma “sensação da agulha”, que é enfatizada na prática clínica pelo acupunturista (HAKER; LUNDEBERG, 1990; HUI et al, 2005; ZHAO, 2008). Essa sensação é descrita como dor, dormência, peso e distensão no tecidos profundos sob o ponto de acupuntura, que pode também ser sentida no dedo do acupunturista, denominado “De-

Qi". O acupunturista pode sentir uma resistência à agulha inserida, semelhante à sensação de um pescador quando o peixe morde a isca (LANGEVIN et al, 2001; KONG et al, 2005; MACPHERSON; ASGHAR, 2006; ZHAO, 2008).

Observações clínicas mostraram que agulhas inseridas nos membros inferiores de indivíduos paraplégicos falharam em produzir o "De-Qi", ou em ter qualquer efeito analgésico na parte superior do corpo. Tanto a sensação do paciente quanto do terapeuta são bloqueados depois da injeção de procaína no músculo sob os pontos de acupuntura. O "De-Qi" originado pela acupuntura é induzido por impulsos nervosos da contração muscular local sob o ponto de acupuntura (SHEN et al, 1973; CAO, 2002; ZHAO, 2008). Outra possibilidade é que o "De-Qi" aconteça pelo acoplamento mecânico entre a agulha e o tecido conjuntivo, pelo ato de enrolar o tecido conjuntivo em volta da agulha durante a rotação da mesma quando o terapeuta está manipulando. Os movimentos da agulha podem proporcionar um sinal mecânico ao tecido e pode ser a chave para a terapêutica do mecanismo da acupuntura (ZHANG et al, 2007; ZHAO, 2008). De fato, quando a agulha de acupuntura é inserida na pele em um designado ponto do corpo, uma variedade de componentes neurais são estimulados, chamado como unidade neural de acupuntura (UNA), observado na Figura 4 (ZHANG et al, 2012).

Como a agulha de acupuntura é um estímulo sensorial físico, a intensidade, frequência, duração e intervalo entre os estímulos influenciam diretamente os tipos de receptores periféricos que serão ativados. Os tipos de fibras nervosas aferentes ativadas pela acupuntura podem ser diversos, dependendo do método de manipulação da agulha e diferenças individuais na sensibilização pela acupuntura. Quando as agulhas são torcidas para cima e para baixo repetidamente, os tecidos profundos, particularmente o músculo, são localmente feridos; assim mediadores pró-inflamatórios, como a histamina, a bradicinina, prostaglandinas, serotonina e ATP, são liberados e excitam nociceptores direta ou indiretamente. É, portanto, possível que fibras do tipo C estejam envolvidas na indução da analgesia pela acupuntura manual (BOUCHER et al, 2000; MEYER et al, 2005; ZHAO, 2008, ZHANG et al, 2012). Estudos sugerem que fibras do tipo A δ também possam ser responsáveis pela ação da acupuntura manual. A analgesia da acupuntura é semelhante à evocada pelo controle inibitório difuso da dor (DNIC) que é mediado por fibras A δ e C. Além disso, clinicamente, a sensação da acupuntura pode permanecer por várias horas ou dias após a

retirada das agulhas, apoiando o envolvimento dessas fibras nociceptivas (BING; VILLANUEVA; LE BARS, 1990; OKADA; KAWAKITA, 2009; SCHLIESSBACH et al, 2012).

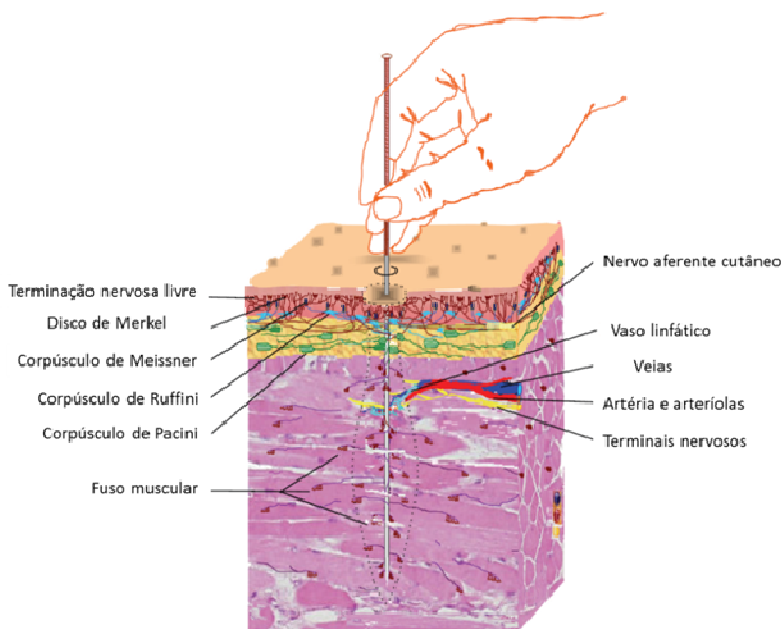
Pesquisadores relatam a participação de fibras nociceptivas também no caso de uso da eletroacupuntura; porém, devido a algumas contradições, se aceita somente a participação de fibras do tipo A δ . Os tipos de fibras excitadas pelos eletrodos na superfície da pele no local dos acupontos são do tipo A β (grupo II) e parte das fibras A δ (grupo III), dependendo do tipo e intensidade do estímulo elétrico (HAN, 2003; ZHAO, 2008; OKADA; KAWAKITA, 2009). Assim, os tipos de fibras nervosas aferentes ativadas pela acupuntura dependem, sobretudo, do método de manipulação e diferenças individuais na sensibilidade: acupuntura manual - todos os tipos de fibras aferentes são ativadas para conduzir o sinal da agulha (A β , A δ e C); eletroacupuntura - a corrente elétrica através das agulhas de acupuntura em intensidades fortes o suficiente podem excitar fibras aferentes A β e parte das fibras A δ (ZHAO, 2008).

A analgesia da acupuntura é essencialmente uma manifestação de processos de integração em diferentes níveis do SNC com impulsos aferentes das regiões de dor e impulsos advindos dos pontos de acupuntura. Os terapeutas podem usar a teoria dos canais ou meridianos, por quais passam os pontos de acupuntura, para fazer a escolha dos pontos durante o tratamento. Sabe-se que a maior parte dos meridianos na parte externa do corpo (onde se encontram localizados os acupontos), inicia e termina no mesmo membro, sejam membros superiores ou inferiores; assim, é consistente com o princípio da inervação espinal segmentar da neurofisiologia moderna. Os segmentos do corpo compreendem dermatômos, miótômos, esclerótômos e viscerótômos, em que há o mesmo nível de inervação sensorial e entrada no corno dorsal da medula espinal. O uso de pontos de acupuntura próximo ao local da lesão, por alguns pesquisadores, demonstra que eles podem ser mais eficazes do que acupontos distantes da lesão em grande parte dos tratamentos para aliviar a dor (WU et al, 1974; DAI et al, 2001; ZHAO, 2008).

Assim, após o estímulo da agulha da periferia passar pela medula espinal, os impulsos dos pontos de acupuntura ascendem principalmente através do funículo ventrolateral. Uma complexa rede de várias estruturas encefálicas está envolvida no processamento da analgesia pela acupuntura. Dentre elas estão o bulbo rostroventral (principalmente o núcleo da Rafe), a PAG, locus coeruleus, núcleo arqueado, área pré

óptica, núcleo accumbens, núcleo caudado, amígdala, córtex cingulado anterior e núcleo paraventricular do hipotálamo entre outros. A maioria dos núcleos é parte constitutiva do sistema descendente inibitório endógeno da dor no SNC. A ativação desse sistema parece ser um dos mecanismos mais relevantes para a analgesia da acupuntura, principalmente da eletroacupuntura (ZHAO, 2008; OKADA; KAWAKITA, 2009). O estímulo da acupuntura, quando associada ao “De-Qi”, evoca a desativação de uma rede de estruturas do sistema límbico, bem como a ativação de regiões somatossensoriais do encéfalo. A ativação da acupuntura no encéfalo é integrada em vários níveis, do tronco encefálico ao cerebelo (HUI et al, 2010).

Figura 4 – Representação do músculo com uma UNA em resposta aos estímulos manuais com a agulha.



A UNA possui componentes neurais ilustrados na linha pontilhada, eles são estimulados principalmente pela torção da agulha - produzindo diferentes efeitos nos receptores localizados no tecido cutâneo e muscular.

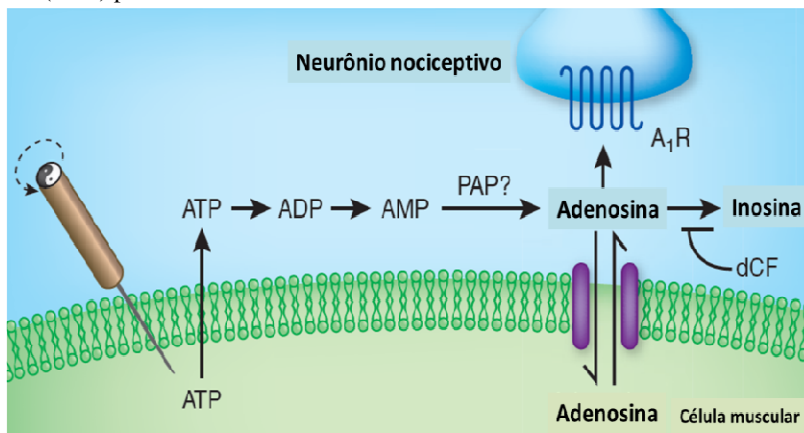
Fonte: Adaptado de Zhang et al (2012).

Com a participação dessas estruturas do SNP e SNC, várias moléculas de sinalização participam da analgesia pela acupuntura. Diversos autores mostram que diferentes moléculas endógenas e seus receptores, como peptídeos opióides (receptores μ , δ e κ), o octapeptídeo colecistocinina (CCK-8), glutamato (receptores NMDA, AMPA e Kainato), serotonina (5-HT) e noradrenalina (HAN, 2004; ZHAO, 2008). Dentre as moléculas descritas, os peptídeos opióides e seus receptores possuem um papel importante na analgesia por acupuntura, e sua atividade é discutida por muitos autores (ZHAO, 2008; HAN, 2011). O efeito analgésico produzido por eletroacupuntura em humanos e animais em diferentes acupontos, como Zu-San-Li (ST36) e San-Yin-Jiao (SP6), está associado ao aumento de opióides endógenos no SNC (HAN, 2003; ZHAO, 2008). Outros autores demonstraram a participação de receptores A1 adenosinérgicos no efeito antinociceptivo local da acupuntura manual em camundongos, onde há liberação de adenosina no sítio de inserção da agulha de acupuntura. Eles provaram ainda que a acupuntura não causa efeito antinociceptivo em animais que não expressam o receptor A1 adenosinérgico, e que a administração de um fármaco agonista de receptores A1 administrado no ponto de acupuntura ST36 produz efeito antinociceptivo similar ao efeito da agulha (GOLDMAN et al, 2010). A acupuntura causou liberação de ATP, especialmente a partir de queratinócitos da pele e do músculo após a lesão pela manipulação da agulha. O ATP é convertido em adenosina, e assim, quando a acupuntura manual foi combinada com a supressão farmacológica da atividade da enzima adenosina desaminase, aumentando a disponibilidade da adenosina, pode-se potencializar o efeito do tratamento com acupuntura manual (SAWYNOK et al, 1998; GOLDMAN et al, 2010). Estes trabalhos nos mostram a influência do sistema adenosinérgico no efeito analgésico da acupuntura (Figura 5).

Os mecanismos analgésicos e anti-inflamatórios da acupuntura podem ser explicados com base molecular e neurofisiológica, especificamente através do mecanismo de eixo hipotálamo-hipófise (pituitária)-adrenal (HPA). A hipótese de que a acupuntura ativa o eixo HPA, além do controle descendente inibitório da dor (envolvendo opióides endógenos), sugere que existe um possível mecanismo anti-inflamatório em conjunto com um suporte neuroimune dependente de mecanismos colinérgicos anti-inflamatórios. Uma fraca ou adequada resposta simpática, como exercícios leves ou acupuntura, suprimem a inflamação liberando noradrenalina (ver revisão em CHO et al, 2006). O biofeedback e a acupuntura têm sido usados para modular a atividade do

nervo vago no controle não só da dor, mas também para alterar a função intestinal, acidez gástrica e frequência cardíaca (TRACEY, 2002). Pode-se, portanto, descrever efeitos modulatórios periféricos, segmentares, centrais ou extrasegmentares da acupuntura (CHO et al, 2006; ZHAO, 2008; HUI et al, 2010).

Figura 5: Efeito antinociceptivo da acupuntura através da ativação de receptores A1 (A1R) pela adenosina.



As agulhas de acupuntura são inseridas nos tecidos e depois manualmente torcidas para cima e para baixo. Isto estimula a liberação de ATP (adenosina trifosfato), que é metabolizado em adenosina extracelular por ectonucleotidasas. O ATP será convertido em ADP (adenosina difosfato) e depois AMP (adenosina monofosfato) até ser convertido em adenosina. A ectonucleotidase fosfatase ácida prostática (PAP) pode hidrolisar o AMP em adenosina, nos locais dos pontos de acupuntura. A acupuntura conduz à ativação de A1R (receptor 1 de adenosina), produzindo um efeito localizado de inibição da dor. A adenosina pode ser metabolizada (inativada) em inosina por adenosina-desaminase ou transportadas para as células. A deoxicoformicina (dCF) inibe a adenosina deaminase e prolonga a ativação do A1R.

Fonte: Adaptado de Zylka, 2010.

1.4.2 Pontos de acupuntura

O tratamento com acupuntura baseia-se na inserção de agulhas em pontos específicos na superfície corporal, que são conhecidos em chinês como Shu Xue. A palavra Shu significa passagem ou comunicação e Xue quer dizer cavidade ou buraco. Portanto, Shu Xue significa aberturas ou buracos na pele de comunicação ou transporte

(MACPHERSON; SINCLAIR-LIAN; THOMAS, 2006). Esses pontos de acupuntura foram encontrados através do conhecimento empírico pela prática clínica por séculos. Com o tempo, percebeu-se que a manipulação em determinados locais do corpo aliviava os desconfortos e/ou curava algumas doenças (BOVEY et al, 2005). Existem 361 pontos de acupuntura passando pelos Jing Luo, onde já foi demonstrada a relação da inervação dos diferentes tecidos debaixo desses pontos de acupuntura, incluindo epiderme, derme, tecido subcutâneo, músculo e órgão tendinoso. Também foi demonstrado que fibras aferentes que innervam a pele não são tão importantes na mediação dos sinais de acupuntura, e sim as fibras aferentes dos músculos (CHIANG et al, 1973; ZHAO, 2008).

Cerca de 71% dos pontos de acupuntura coincidiam com os pontos gatilho nos músculos (ZHAO, 2008; OKADA; KAWAKITA, 2009). Há locais hipersensíveis nas estruturas miofasciais, que quando estimulados, ampliam a área de dor para região adjacente ou distante, e o agulhamento nesses pontos-gatilhos produz alívio da dor (HIRSH et al, 2005). De forma semelhante, livros chineses do Período dos Estados Combatentes (475-221 a.C.) descrevem que o princípio inicial da acupuntura baseou-se na escolha dos pontos e inserção das agulhas no local da dor (Pontos Ah Shi) (BOVEY et al, 2005). Alguns autores sugerem também que os pontos de acupuntura podem apresentar baixa resistência elétrica e alta capacitância (ver revisão em AHN et al, 2008).

A agulha de acupuntura inserida diretamente no acuponto ST36 (Zusanli), em camundongos, foi capaz de liberar adenosina localmente (GOLDMAN et al, 2010). Takano e colaboradores (2012) verificaram, em humanos, que a adenosina não é liberada localmente se a agulha não for inserida exatamente no local do ponto de acupuntura ST36 ou se não for realizada manipulação da mesma. Os pesquisadores inseriram e manipularam a agulha próxima ao local do acuponto, mas não exatamente no mesmo lugar, considerado por eles como falsa acupuntura; ou inseriram a agulha, mas não a manipularam (giraram), e avaliaram os níveis de adenosina presente no local da inserção da agulha. Eles verificaram que, em ambos os casos, não houve aumento de adenosina local (falso ponto ou sem manipulação). Este estudo confirma o papel da adenosina na antinocicepção/analgesia alcançada com a acupuntura, fornecendo evidências em humanos (TAKANO et al, 2012).

A falsa acupuntura muitas vezes serve como um controle na pesquisa, principalmente clínica. Os dois procedimentos falsos mais usados são: (1) a inserção de agulhas de acupuntura em pontos controle

à determinada distância do acuponto real (1-3 cm geralmente) e, (2) agulhamento placebo sobre os pontos de acupuntura (sem punтура). O uso desses procedimentos como controle foram inicialmente projetados para diferenciar efeitos específicos da acupuntura em pontos de acupuntura, comparando não-pontos de acupuntura. No entanto, clinicamente, pode ser difícil diferenciar os efeitos de pontos de acupuntura ou não, pois mesmo em não acupontos, as agulhas podem excitar mecanorreceptores e nociceptores. Isto pode explicar, pelo menos em parte, porque a maioria dos estudos clínicos falhou em demonstrar eficácia superior na acupuntura "real" (ou "verdadeira"), comparados à falsa acupuntura ou placebo. Somadas a essa explicação física, o fato do humano ter percepções emocionais muito mais explícitas do que animais, o comportamento do terapeuta, ou os fatores emocionais do paciente no momento do tratamento podem interferir no resultado da acupuntura (ERNEST et al, 2011; ZHANG et al, 2012).

Existe grande discussão acerca da especificidade da acupuntura; além disso, existe discussão também a respeito da especificidade dos pontos de acupuntura. Apesar de nenhum trabalho ter demonstrado comprovadamente essa teoria, com base em trabalhos atuais, parece que os acupontos são específicos para algumas doenças, como a hipertensão, mas não para outras como a fibromialgia (ASSEFI et al, 2005; LUNDEBERG; LUND, 2007; MAYHEW; ERNST, 2007; ZHANG; BIAN; LI, 2010). Devido a insuficiência de provas, a especificidade dos pontos de acupuntura e os efeitos do seu tratamento não foram ainda devidamente confirmados. Mesmo assim, mecanismos segmentares na medula espinal contribuem para essa possível especificidade funcional relativa aos acupontos (ZHAO, 2008; ZHANG; BIAN; LI, 2010).

Com base nesses estudos, procuramos investigar os efeitos de um ponto bastante utilizado na prática clínica e na pesquisa com acupuntura. O acuponto SP6 (Baço6 ou Spleen 6) possui o nome chinês de Sanyijiao, do Mandarin san (três), yin (antônimo de yang), jiao (intersectar), devido ao fato de que na MTC acredita-se que neste ponto ocorra a intersecção dos três meridianos yin da perna (Rim, Fígado e Baço-Pâncreas) (TABOSA et al, 2002).

Em humanos o SP6 localiza-se a 3 cuns (medida da MTC referente a 4 dedos da pessoa) acima do cume do maléolo medial, na borda pósterio-medial da tíbia (DEADMAN; BAKER; AL-KHAFAJI, 1998); em camundongos está localizado na região proximal da tíbia, 0,5 mm acima do maléolo medial (YIN et al, 2008). O acuponto SP6 é um ponto do canal do baço, que também funciona como um importante

ponto geral de tonificação indicado em vários distúrbios, incluindo alterações ginecológicas, geniturinária, alérgica, insônia, doenças imunológicas e psicossomáticas e controle da dor (LIM, 2010; CHENG et al, 2012).

O SP6 está entre um dos pontos mais utilizados na prática clínica, com uma grande área de ação, sendo tradicionalmente indicado em casos de desconforto abdominal, na região do peito, baixo ventre e membros inferiores, amenorreia, menstruação irregular, disúria, insônia, palpitações, amnésia e letargia, dentre outros. Ele não é um dos pontos com mais ação analgésica, mas pode ter efeito em muitos casos de dor (YAMAMURA, 2001). Pode ainda ser usado para o tratamento da dor na região do coração ou no peito, dor abdominal ou dismenorreia, podendo ser também usado em alguns casos de dor de cabeça e enxaqueca (ROSS, 2002).

Segundo a Medicina Tradicional Chinesa, com relação ao efeito analgésico, o SP6 parece apresentar ação de diminuir obstruções (síndromes de obstruções energéticas) e interromper a dor, particularmente na região do baixo ventre (MACIOCIA, 1994).

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, renomados pesquisadores estão discutindo sobre a efetividade da acupuntura e seus reais mecanismos. Sendo assim, é o momento de buscarmos a autêntica atuação da acupuntura sobre a dor e a inflamação, bem como os mecanismos pelos quais ela exerce esse efeito (ERNEST et al, 2011; HAN, 2011).

Baseado nas divergências sobre a validade e eficácia do tratamento com acupuntura na Medicina Ocidental, pesquisas científicas são importantes no intuito de tornar essa técnica comprovadamente eficaz, e para se conhecer em que casos ela apresenta efeito evidente. Por outro lado, é importante estudar os efeitos neurobiológicos da acupuntura, evitando encontrar um efeito “não específico” ou “placebo” desta terapia; especialmente na dor, que apresenta um amplo caráter emocional. Neste sentido, estudos com animais ainda são necessários. Esses estudos também são importantes para fornecer evidências claras sobre os mecanismos de ação pelos quais a acupuntura exerce seu efeito, visto que várias abordagens farmacológicas, genéticas, bioquímicas e imunohistoquímicas não podem ser realizadas em humanos.

A acupuntura é uma técnica de custo reduzido para a pesquisa, pois há apenas o gasto do experimento em si com animais e metodologias utilizadas, além das agulhas. Diferentemente de pesquisas que se utilizam de extratos ou compostos de plantas que são estudados para o tratamento da dor, não há dificuldade de acesso ao material necessário para o tratamento. Além disso, não há necessidade de extração ou isolamento do composto/extrato. A terapia com acupuntura também é uma técnica com custo reduzido, comparada a terapias convencionais na clínica, como medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios, além de não possuir efeitos adversos como a maioria desses fármacos.

A escolha de um ponto de acupuntura isoladamente (SP6) é relevante porque não existe na literatura um trabalho realizado com rigoroso padrão científico, buscando especificamente o efeito de um acuponto sobre a dor aguda e crônica e sobre a inflamação. Além disso, poucos pesquisadores buscam saber quais os mecanismos pelos quais um acuponto exerce efeito sobre esses sinais ou sintomas. Assim, este estudo é importante para explicar a efetividade e os mecanismos de ação de uma técnica milenar Oriental tão controversa na visão Ocidental.

Desta forma, a hipótese deste trabalho é que a realização da acupuntura manual no acuponto SP6 possa ter efeito antinociceptivo e

anti-inflamatório em diferentes modelos de nocicepção e inflamação em camundongos e que esses efeitos sejam observados por mecanismos neurobiológicos específicos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito da acupuntura manual realizada no acuponto SP6 (Spleen 6 ou Baço Pâncreas 6) na nocicepção aguda e crônica e na inflamação, além de investigar os possíveis mecanismos de ação pelos quais a acupuntura no acuponto SP6 exerce seu efeito antinociceptivo e anti-inflamatório.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um esquema de tratamento eficaz com acupuntura manual no acuponto SP6 em camundongos;

- Analisar o efeito da acupuntura no acuponto SP6 no modelo de nocicepção crônica (neuropática) induzida pela ligadura parcial do nervo ciático (LPNC) em camundongos;

- Analisar o efeito antinociceptivo da acupuntura manual nos acupontos SP6, ST35, BL57, KI3, GB39 e LR5 em diferentes modelos de nocicepção aguda em camundongos;

- Avaliar os mecanismos pelos quais a acupuntura realizada no acuponto SP6 exerce seu efeito antinociceptivo em camundongos;

- Investigar o efeito anti-inflamatório da acupuntura no acuponto SP6 no modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos, bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos no seu efeito;

- Verificar o efeito da acupuntura no acuponto SP6 em modelo de dor muscular induzida por carragenina no músculo gastrocnêmio em camundongos, além de analisar os possíveis mecanismos de ação envolvidos no seu efeito.

4 METODOLOGIA E RESULTADOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss (30 – 40 g) machos fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil). Também foram utilizados camundongos C57BL/6J (20 – 30 g) do tipo selvagens (IL10+/+) e nocautes para o alelo I/10tm1Cgn, que codifica a citocina anti-inflamatória IL-10 (IL10-/-), fornecidos pela Universidade de Iowa (Iowa City, IA, USA), onde tais experimentos foram realizados. Os animais fornecidos pela Universidade de Iowa foram obtidos do “The Jackson Laboratory”, onde “C57BL” indica a designação das cepas ou estirpe dos pais dos animais usados (eles usam 20 ou mais gerações), a “/” (barra) separa a cepa dos pais das subcepas, “6” indica o número da linhagem, “J” indica a subcepa, ou seja, “6J” indica o código de subcepa do próprio laboratório.

Os camundongos foram mantidos em câmaras isoladas contendo no máximo 7 animais por caixa, com ventilação, sob condições controladas de temperatura (22 ± 1 °C) e umidade (60 - 80%) em ciclos de 12 horas claro-escuro (7:00 às 19:00 horas), além de livre acesso a água e ração. Os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo.

Para os estudos comportamentais, os animais foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos. Estes foram conduzidos de acordo com as orientações e considerações éticas para investigação de dor experimental em animais (ZIMMERMANN, 1983).

O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos, sendo que os experimentos foram realizados cego ou duplo cego, sempre que possível. Todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, protocolo número PP00208) ou pela Universidade de Iowa (Iowa City, IA, USA, protocolo número 0908193).

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística entre os grupos do experimento foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA de uma via) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, ou ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey com múltiplas comparações, ou análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias), seguida de teste post hoc de Bonferroni, quando necessário. O valor de $P < 0,05$ foi considerado como indicativo de significância. Foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.0 (San Diego, CA: 2008) ou o software SPSS 13.0.

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Na parte I deste trabalho foram realizados os testes de nocicepção aguda e padronização do tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6, foram realizados experimentos para verificar efeito da acupuntura no SP6 em teste de nocicepção crônica e avaliação do efeito de diferentes acupontos em testes agudos de nocicepção. Na parte II foram verificados os mecanismos neurobiológicos endógenos que poderiam estar envolvidos no efeito antinociceptivo do acuponto SP6. Nas partes III e IV foi analisado o efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 em modelos de inflamação aguda e dor inflamatória crônica. Todos os camundongos utilizados nas partes I, II e III foram camundongos do tipo Swiss; contudo, os camundongos utilizados na parte IV foram animais C57BL/6J do tipo selvagens (IL-10+/+) ou nocaute para o alelo I/10tm1Cgn, que codifica a IL-10 (IL-10/-). Foram utilizados 6-8 animais em cada grupo experimental, com exceção das avaliações de imunohistoquímica onde foram usados 5-6 animais por grupo.

As primeiras etapas deste estudo foram realizadas no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI), do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, coordenado pelo Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos. A parte IV deste trabalho foi realizada no Programa de Neurociências da Universidade de Iowa (Iowa City, IA, USA), no Centro de Fisioterapia, no Laboratório de Neurobiologia da Dor coordenado pela Profa. Dra Kathleen A. Sluka. A realização de todos esses estudos foi possível graças às bolsas de estudos fornecidas pela CAPES, tanto para a realização do doutorado no Brasil como a bolsa de estudos do Programa

de Doutorado Sanduíche no Exterior, durante os meses de estágio no Laboratório de Neurobiologia da Dor, na Universidade de Iowa.

4.4 PARTE I: EFEITO DA ACUPUNTURA MANUAL EM MODELOS DE NOCICEPÇÃO AGUDA

4.4.1 Metodologia

4.4.1.1 Tratamento com acupuntura no acuponto SP6

A identificação do acuponto SP6 em camundongos foi realizada de acordo com o estudo de Yin et al (2008), que identifica a localização de vários pontos de acupuntura em ratos e camundongos. O SP6 em camundongos está localizado no ponto distal de uma linha imaginária dividida em cinco pontos, que liga o ponto SP9 (localizado na depressão inferior ao côndilo medial da tíbia, entre a tíbia e o gastrocnêmio) ao maléolo medial da tíbia (YIN et al, 2008).

Para o tratamento com acupuntura os animais foram contidos cuidadosamente em um cilindro de polietileno (7 cm x 2,5) com as patas traseiras para fora do cilindro. A pele dos animais foi limpa com álcool e a estimulação da acupuntura manual foi realizada pela inserção de uma agulha de aço inoxidável (0,17 x 7 mm) utilizando para isso um aplicador (Figura 6). A agulha de acupuntura foi inserida obliquamente a uma profundidade de cerca de 2 - 3 milímetros no acuponto alvo, na pata direita, e então manipulada com as pontas dos dedos do experimentador (girada lentamente para a direita e esquerda de 1-2 segundos). Todo o procedimento levou menos de 15 segundos.

Figura 6 – Fotos demonstrando as etapas para o tratamento com acupuntura.



Contenção em um cilindro de polietileno (A), inserção com auxílio de aplicador (B) e demonstração do acuponto SP6 com agulha (C).

Depois de inserir a agulha, cada animal foi colocado em uma caixa de acrílico transparente (10 cm x 10 cm x 10 cm) por 10 minutos. Os animais permaneceram acordados, sem sinais de estresse e foram observados durante todo o período de estimulação da acupuntura. Os animais contidos no mesmo cilindro de polietileno, pelo tempo aproximado da realização da acupuntura (cerca de 15 segundos), mas que não foram punturados, foram usados como controle nos teste de nocicepção para a padronização do tratamento com acupuntura manual.

4.4.1.2 Padronização do tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6

4.4.1.2.1 *Modelo de nocicepção induzida por ácido acético*

Antes do início de todos os tratamentos os animais permaneceram na sala de experimentação para aclimação por pelo menos uma hora. Primeiramente foi verificado se a estimulação com agulha no acuponto SP6 poderia resultar em antinocicepção, e se este efeito seria dependente do tempo em que a agulha permaneceria inserida no animal. Esta avaliação corresponderia a uma espécie de “dosimetria” para a agulha. Para isto, camundongos do tipo Swiss foram homogeneamente separados em cinco (5) grupos. Sendo que a agulha permaneceu inserida no acuponto SP6 por diferentes tempos: 1, 5, 10, 15 ou 30 minutos, na pata direita. Após esses períodos, a agulha foi retirada e imediatamente os animais receberam uma solução de ácido acético (0,6%, 0,45 ml/animal) por via intraperitoneal sendo contabilizado o número de contorções abdominais em 20 minutos. É importante salientar que o ácido acético é capaz de induzir dor, que é caracterizada por contorções abdominais, que consiste da contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores (KOSTER;ANDERSON; DE BEER, 1959; SANTOS et al, 1999).

Em outra série de experimento, foi verificada a duração do efeito antinociceptivo causado pela estimulação do acuponto SP6. Para isso, grupos distintos de camundongos tiveram a agulha inserida no acuponto SP6 e mantida por 10 minutos, na pata posterior direita, e imediatamente após o tratamento, 15, 30, 60, 90, 120 ou 240 minutos os animais receberam ácido acético (0,6% i.p., 0,45 ml/animal) e foi contabilizado o número de contorções abdominais em 20 minutos.

Na segunda etapa de padronização foi verificada a diferença entre grupos de animais que tiveram a agulha inserida uma ou mais vezes

durante o tratamento. Esta avaliação foi realizada devido ao fato dos camundongos permanecerem livres durante o tratamento, implicando na retirada da agulha pelos mesmos ou a saída desta por si só, devido à deambulação dos animais, havendo nestes casos a reinserção da agulha. Portanto, em diferentes grupos de camundongos, a agulha foi inserida 1, 2 ou 3 vezes no acuponto SP6 (obedecendo o mesmo período de 10 minutos de tratamento) e 15 minutos após, foi injetado ácido acético, procedendo-se a avaliação por 20 minutos. Outro aspecto avaliado na padronização foi que não houve diferença estatística entre o grupo de animais que recebeu tratamento com acupuntura e manipulação da agulha e do grupo de animais que recebeu tratamento com acupuntura, porém sem manipulação da mesma. A manipulação da agulha consistia na torção da mesma para ambos os lados e para cima e para baixo por cerca de 10 segundos, a sensação de “De-Qi” nos dedos do experimentador era difícil de ser percebida, por isso, a manipulação foi realizada da mesma forma em todos os camundongos.

A diferença entre o tratamento unilateral ou bilateral do acuponto SP6, também foi analisada. Para tanto, a agulha foi inserida no acuponto SP6 por 10 minutos na pata direita ou na pata esquerda ou bilateralmente (em ambas as patas). Após a retirada da(s) agulha(s) foi injetado o ácido acético, sendo contabilizado o número de contorções em 20 minutos.

4.4.1.2.2 Modelo de nocicepção induzida pela formalina

Antes do início de todos os tratamentos os animais permaneceram na sala de experimentação para aclimação por pelo menos uma hora. Para confirmar o efeito antinociceptivo da acupuntura manual realizada no acuponto SP6, foi utilizado outro modelo de nocicepção aguda, que é a injeção de formalina intraplantar (i.pl.), onde se pode observar a resposta à primeira fase (dor neurogênica) e à segunda fase (dor inflamatória) da formalina (HUNSKAAR; FASMER; HOKE, 1987). Ainda nesta etapa, foi observado se o tratamento unilateral (pata direita ou esquerda) ou bilateral com a agulha apresentava diferença nesse modelo de nocicepção aguda. Assim, após os respectivos tratamentos com acupuntura (10 minutos de retenção da agulha) foi administrada 20 µL de formalina na superfície ventral da pata direita do animal (15 minutos após a retirada da agulha), contabilizando o tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada de 0-5 minutos (1ª fase) e de 15-30 minutos (2ª fase).

4.4.1.3. Avaliação de vias periféricas envolvidas na antinocicepção da acupuntura manual no acuponto SP6

Antes do início de todos os tratamentos os animais permaneceram na sala de experimentação para aclimação por pelo menos uma hora. Estudos demonstram que os pacientes tratados com acupuntura referem sensações como formigamento e choque, bem como apresentam alterações eletromiográficas. Sabe-se que ao se injetar procaína (anestésico local do grupo amino éster) nos acupontos e depois tratar com acupuntura, o efeito antinociceptivo desta terapia é eliminado, sugerindo que o efeito da acupuntura depende da estimulação direta ou indireta de impulsos nervosos oriundos do músculo, bem como de outros tecidos periféricos adjacentes (ZHAO, 2008; SHEN, 1973; OKADA; KAWAKITA, 2009). De fato, algumas evidências têm revelado que diferentes tipos de fibras nervosas aferentes são ativadas com o uso de acupuntura, dependendo do tipo de manipulação da agulha e métodos empregados (SHEN, 1973; OKADA; KAWAKITA, 2009).

4.4.1.3.1 Participação das fibras sensoriais sensíveis à capsaicina no efeito da acupuntura

Para explorar o papel de fibras sensíveis à capsaicina no efeito antinociceptivo do acuponto SP6, os camundongos recém-nascidos foram tratados no segundo dia de vida com 50 mg/kg de capsaicina subcutâneamente. Este tratamento tem por objetivo causar degeneração irreversível de neurônios aferentes primários, principalmente fibras do tipo C que expressam o receptor TRPV1 (HOLZER, 1991; SANTOS et al, 2005). Os animais controle receberam o mesmo volume de veículo, administrado pela via subcutânea (s.c.), usado para diluir a capsaicina (10% de etanol, Tween 80 e 80% de salina).

O efeito antinociceptivo da acupuntura, contra a resposta algésica induzida pelo ácido acético, foi analisada dois meses depois da injeção de capsaicina ou veículo. Para tanto, os animais receberam ácido acético (0,6%, 0,45 ml/animal, i.p.), sendo contabilizado o número de contorções abdominais em 20 minutos. A eficácia do tratamento neonatal com capsaicina ou veículo foi confirmada, antes das avaliações comportamentais com ácido acético, através da aplicação tópica de capsaicina (50 µl de capsaicina – 0,01%) nos olhos dos animais. Foi contabilizado o número de vezes em que o animal coçou o olho no período de um minuto (IKEDA et al, 2001; SANTOS et al, 2005).

4.4.1.3.2 Participação de fibras nervosas periféricas no efeito da acupuntura

Também no intuito de avaliar a participação de fibras sensoriais na antinocicepção da acupuntura manual realizada no acuponto SP6, foi utilizada a lidocaína, que é um bloqueador rápido dos canais de sódio, usada como anestésico local. A lidocaína foi empregada com o intuito de prevenir a ativação de fibras periféricas. Para tanto, a lidocaína (20 µl – 1%) ou salina (20 µl) foram administradas via subcutânea no local anatômico do SP6, 15 minutos antes do tratamento com acupuntura manual (BINSHTOK et al, 2009). Decorridos 10 minutos do tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6, os animais receberam ácido acético intraperitonealmente e foi contabilizado o número de contorções abdominais em 20 minutos.

4.4.1.4 Efeito da acupuntura em diferentes acupontos

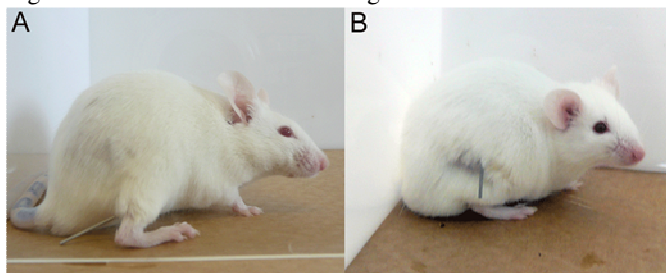
Após verificar o efeito antinociceptivo da estimulação com agulha no acuponto SP6, foi iniciada uma série de experimentos onde outros acupontos foram testados nos mesmos modelos experimentais de nocicepção aguda (ácido acético e formalina), para verificarmos a especificidade do efeito da acupuntura. O termo especificidade em acupuntura é discutido por pesquisadores que trabalham com esta terapia; alguns não gostam de usar essa palavra, que indica aquilo que é capaz de agir de modo específico. Alguns autores levam em consideração a especificidade do efeito da acupuntura por mecanismos segmentares na medula espinal (ZHANG; BIAN; LIN, 2010; ZHAO, 2008), ou seja, de acordo com a inervação dos acupontos pode-se delimitar seus efeitos. Portanto, neste trabalho, foram utilizados acupontos que estivessem localizados no mesmo segmento corporal (pata traseira direita), e verificado se a estimulação com agulha resultaria em efeitos antinociceptivos similares.

Nesta etapa, a agulha de acupuntura foi inserida individualmente nos acupontos SP6, ST35, BL57, KI3, GB39 e LR5 descritos previamente por Yin et al (2008). A localização do acuponto SP6 já foi descrita anteriormente, e observam-se animais com a agulha inserida no SP6 na Figura 7. O acuponto ST35 está localizado na depressão lateral do ligamento patelar; o acuponto BL57 está localizado no ponto médio entre o acuponto BL40 e o BL60; o acuponto KI3 está localizado na depressão posterior ao maléolo medial da tíbia; o acuponto GB39 está

localizado distalmente ao joelho, entre ele e o maléolo fibular, a uma distância de 4/5 da linha de conexão da face lateral do joelho e lateral do maléolo fibular; por fim, o acuponto LR5 está localizado a 2/3 distais na linha de conexão do lado medial do joelho e medial do maléolo da fíbula (Figura 8).

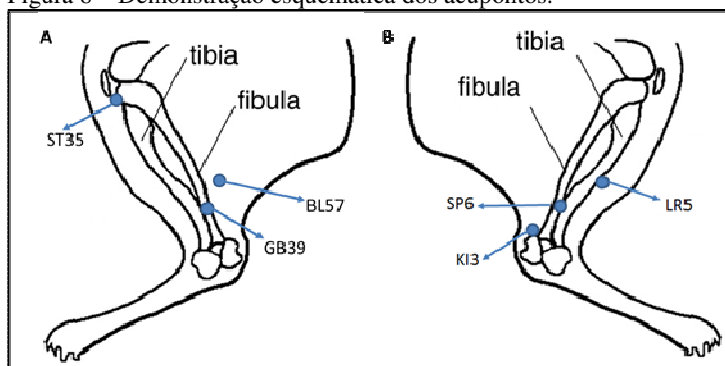
Além dos acupontos citados também foi realizada a inserção da agulha em um falso ponto de acupuntura adaptado para camundongos (MEDEIROS et al, 2003). Esse local foi chamado de “não-acuponto” (NA) e está a 5 mm lateral à linha média da face posterior do membro posterior (5 milímetros de distância do ponto de acupuntura GB30) (Figura 7). Os procedimentos durante o tratamento são os mesmos descritos no item 4.4.1.1.

Figura 7 – Fotos dos animais com agulhas inseridas.



Puntura no SP6 (A) e no NA (B).

Figura 8 – Demonstração esquemática dos acupontos.



(A) Face lateral da pata posterior do camundongo, onde pode-se observar os acupontos ST35, GB39 e BL57 (fica na parte posterior do membro). (B) Face medial da pata posterior do camundongo, onde pode-se observar os acupontos SP6, KI3 e LR5.

4.4.1.4.1 Avaliação da especificidade do efeito da acupuntura em diferentes acupontos na nocicepção induzida pelo ácido acético

Para verificar o efeito de diferentes pontos de acupuntura no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, utilizaram-se diferentes grupos de animais que foram pré-tratados com os acupontos citados anteriormente: SP6, ST35, BL57, KI3, GB39, LR5 e o NA, por 10 minutos na pata direita. Transcorrido o tempo de 15 minutos após a retirada da agulha, os animais receberam uma injeção de ácido acético (i.p.) e o número de contorções abdominais foi contabilizada em 20 minutos. O grupo de animais utilizado como controle recebeu ácido acético (i.p.), porém, não recebeu nenhum tratamento prévio, sendo o número de contorções abdominais quantificado durante um período de 20 minutos. Portanto, foi determinada a atividade antinociceptiva dos acupontos utilizados (SP6, ST35, BL57, KI3, GB39, LR5, NA) comparando os resultados dos grupos separadamente com o resultado do grupo controle, verificando se houve ou não redução do número das contorções abdominais.

4.4.1.4.2 Avaliação da especificidade do efeito da acupuntura em diferentes acupontos na nocicepção induzida pela formalina

Antes do início de todos os tratamentos os animais permaneceram na sala de experimentação para aclimação por pelo menos uma hora. Posteriormente, os mesmos acupontos usados na avaliação do item 4.4.1.4.1., foram testados utilizando-se outro modelo de nocicepção aguda, mais específico, que é o teste da formalina. Para isto, os animais foram individualmente ambientados em funis de vidro transparente e tratados com os pontos SP6, ST35, BL57, KI3, GB39, LR5 e o NA, por 10 minutos na pata direita. Transcorrido o tempo de 15 minutos da retirada da agulha, um volume de 20 µL de solução de formalina 2,5% (0,92% formaldeído) foi injetado intraplantarmente (i.pl.) na superfície ventral da pata direita de cada animal.

Um grupo de animais utilizado como controle recebeu formalina na pata direita, porém, não recebeu tratamento prévio. Após a injeção de formalina foi observado individualmente o tempo que os animais permaneceram lambendo e/ou mordendo a pata injetada, sendo que o período de 0-5 minutos e de 15-30 minutos correspondem a dor neurogênica (1ª. fase) e dor inflamatória (2ª. fase), respectivamente (HUNSKAAR; FASMER; HOKE, 1987). A atividade antinociceptiva

dos acupontos utilizados (SP6, ST35, BL57, KI3, GB39, LR5, NA) foi determinada comparando os resultados dos animais de cada grupo com o do grupo controle, verificando se houve ou não redução do tempo em que os animais permaneceram mordendo e/ou lambendo a pata injetada com formalina.

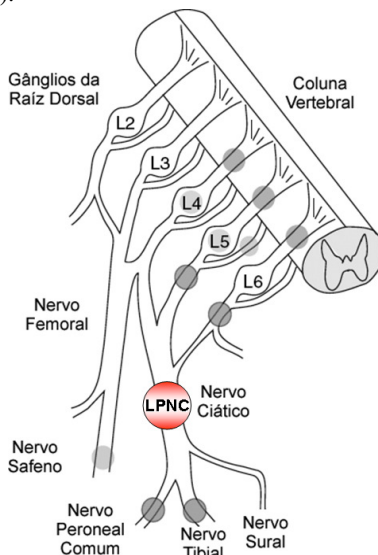
4.4.1.5 Avaliação do tratamento com acupuntura no acuponto SP6 na neuropatia induzida pela Ligadura Parcial do Nervo Ciático

Nesta etapa foi utilizado um modelo de dor crônica de origem neuropática descrito amplamente na literatura: o modelo de Lesão Parcial do Nervo Ciático ou Ligadura Parcial do Nervo Ciático (LPNC), para verificar se a estimulação do acuponto SP6 teria efeito antinociceptivo em modelo animal de dor crônica. Este modelo experimental permite analisar um quadro de dor neuropática induzida cirurgicamente em camundongos.

Anteriormente e após a realização da cirurgia, os animais foram avaliados quanto à sensibilidade mecânica (item 4.4.1.6) e térmica ao calor e ao frio (itens 4.4.1.7 e 4.4.1.8) no modelo descrito a seguir. Este procedimento foi adotado com o objetivo primeiramente de excluir dos experimentos os animais que antes da cirurgia apresentavam hipersensibilidade, e posteriormente, excluir dos experimentos seguintes os animais que não apresentavam sensibilidade mecânica e/ou térmica ao calor e ao frio compatível com as lesões induzidas pela cirurgia.

Os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg, i.p.) e cetamina (80 mg/Kg, i.p.) e após tricotomia, efetuou-se pequena incisão na região da coxa direita entre os músculos quadríceps e o isquiotibial. Os músculos da região foram divulsionados com uma pinça cirúrgica onde foi visualizado o nervo ciático. O mesmo, foi exposto e as veias dissecadas dos tecidos aderentes de acordo com o método descrito para ratos (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990) e adaptado para camundongos (MALMBERG; BASBAUM, 1998). Após o procedimento descrito, aproximadamente 1/3 do nervo ciático foi amarrado (Figura 9) com um fio de sutura (Ethicon, Cardiovascular, 6.0 Prolone, não absorvível) e após, a epiderme foi suturada com fio 4.0 (Ethicon, Cardiovascular, Ethibond).

Figura 9: Localização anatômica da realização da cirurgia de ligadura parcial do nervo ciático (LPNC).



Fonte: Adaptado de Decosterd e Berta, 2009.

Os animais permaneciam em mesa cirúrgica aquecida a 35°C até sua recuperação; posteriormente, os mesmos foram recolocados em suas gaiolas moradias e mantidos em condições ideais de laboratório durante a realização do experimento. No grupo de animais controle negativo, foi realizado o procedimento cirúrgico e o nervo foi exposto, contudo, o mesmo não foi amarrado (não houve constrição parcial do nervo), sendo denominado de grupo Falso Operado (Tabela 1).

Tabela 1: Grupos experimentais usados no modelo de LPNC.

Grupos	Procedimento	Número de animais	Sigla
<i>Controle Operado</i>	Foram submetidos a cirurgia de LPNC e não receberam tratamento posterior	8-10	CO
<i>Falso operado</i>	Foram submetidos ao procedimento cirúrgico, contudo o nervo não foi ligado	8-10	FO
<i>Operado e tratado com acupuntura manual no SP6</i>	Foram submetidos à LPNC e tratados 3 vezes por semana com acupuntura no SP6	8-10	SP6
<i>Operado e tratado com o NA</i>	Foram submetidos à LPNC e tratados 3 vezes por semana com o NA	8-10	NA

4.4.1.6 Avaliação da hipersensibilidade mecânica após LPNC e tratamento com acupuntura manual no SP6

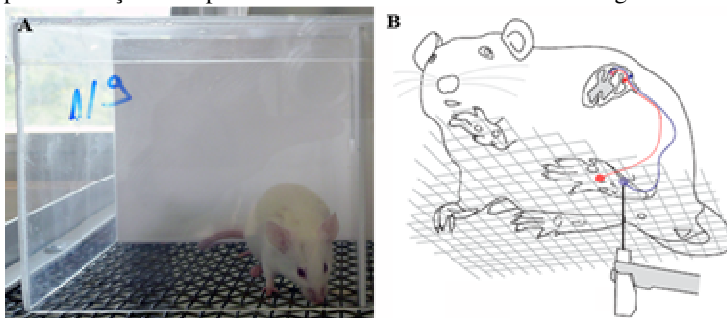
O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado de acordo com o método descrito por Chaplan et al (1994). Os camundongos foram aclimatados por no mínimo 1 hora antes dos experimentos na sala de experimentação, ficando em compartimentos individuais de acrílico (7 x 9 x 11 cm), sobre uma plataforma de fundo gradeado, a fim de possibilitar o acesso à superfície ventral das patas traseiras dos animais (Figura 10).

O estímulo mecânico foi direcionado perpendicularmente à superfície plantar dos animais. Foram analisadas as respostas (retirada ou não da pata) em relação à tensão aplicada por vários filamentos de von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, EUA) calibrados para produzir forças (0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0 gramas), que produzem diferentes graus de estimulação mecânica (inócua ou nociva) (Figura 10). As avaliações foram iniciadas com a aplicação do filamento 0,4 g, e no caso de estímulo nocivo – indicado pela retirada da pata – foi utilizado um filamento com menor valor em gramas. No caso de estímulo inócua – indicado pela permanência da pata – testou-se o filamento com maior valor subsequente em gramas. Foram realizadas um total de no máximo seis aplicações não consecutivas em cada animal. Este método utilizado é denominado de “up-and-down” e foi proposto por Dixon (1980). Os dados obtidos a partir dele fornecem a força correspondente a 50% do limiar de retirada

da pata (em g). Intensa redução no limiar de retirada da pata caracterizava o aparecimento de hipersensibilidade mecânica.

No sétimo dia após a cirurgia de LPNC, os animais foram avaliados pelo método acima descrito, distribuídos homogeneamente em grupos como representado na Tabela 1, e posteriormente iniciou-se o tratamento com acupuntura no acuponto SP6 e no NA. Os animais dos grupos SP6 e NA foram tratados três vezes por semana com acupuntura manual por 10 minutos e avaliados 15 minutos após a retirada da agulha. Os tratamentos foram realizados em dias intercalados (3 vezes por semana) para evitar lesão da pata com inserção repetida da agulha. As avaliações comportamentais foram realizadas diariamente por 26 dias, após o início dos tratamentos.

Figura 10: Demonstração da disposição do animal e do filamento de von Frey para avaliação de hipersensibilidade mecânica em camundongos.



(A) Camundongo sob a plataforma de avaliação e (B) aplicação do filamento de von Frey na superfície ventral da pata do ipsilateral do animal.

Fonte: Adaptado de Basbaum e Bushnell (2009).

4.4.1.7 Avaliação da hipersensibilidade térmica ao calor após LPNC e tratamento com acupuntura manual no SP6

A avaliação da hiperalgesia térmica foi realizada por meio do teste plantar de Hargreaves et al (1988) (Figura 11). Esse teste consiste no aquecimento, por meio de uma fonte luminosa infravermelha dirigida à região plantar média da pata traseira do camundongo, até que o animal apresentasse um comportamento de retirada da pata (aparelho utilizado - Ugo Basile, Comerio, Itália). Quando o animal não apresenta reação de retirada da pata, é estipulado um tempo limite máximo de corte do

experimento (12 segundos), com desligamento da luz, para a preservação da integridade física da pata.

Os animais foram colocados na sala de experimentos para ambientação pelo menos 1 hora antes dos testes, alocados em compartimentos de acrílico (7 x 9 x 11 cm) individual e posicionados sobre uma superfície de vidro especial que permite a passagem de forma homogênea da luz e do calor. Após esse período, uma fonte de luz infravermelha (40 I.R. – intensidade de radiação), colocada sob cada uma das patas traseiras do animal, é acionada juntamente com um cronômetro eletrônico, até que o animal retire a pata, quando, então, a fonte de luz e o relógio param automaticamente.

Foram realizadas três medidas com intervalo de tempo de 5 a 10 minutos. As medidas de latência de retirada da pata foram então expressas como a média entre as três avaliações. A hipersensibilidade térmica ao calor foi avaliada antes da cirurgia para caracterização da resposta basal, 7 dias após a cirurgia e no 1°, 3°, 5°, 7°, 9°, 12°, 14°, 16°, 19°, 21° e 23° dias após o primeiro tratamento.

No sétimo dia após a cirurgia da LPNC, os animais foram avaliados no Hargreaves e distribuídos homogeneamente em grupos, e logo após, iniciou-se o tratamento com acupuntura no acuponto SP6 e no NA. Os animais dos grupos SP6 e NA foram tratados três vezes por semana com acupuntura manual por 10 minutos, sendo que transcorrido o tempo de 15 minutos após a retirada da agulha, os animais foram avaliados. A avaliação foi realizada em dias intercalados, até 21 dias após o início dos tratamentos, avaliados antes e após os tratamentos.

Figura 11: Representação de um aparelho de Hargreaves, usado para avaliação de hipersensibilidade térmica ao calor em camundongos.



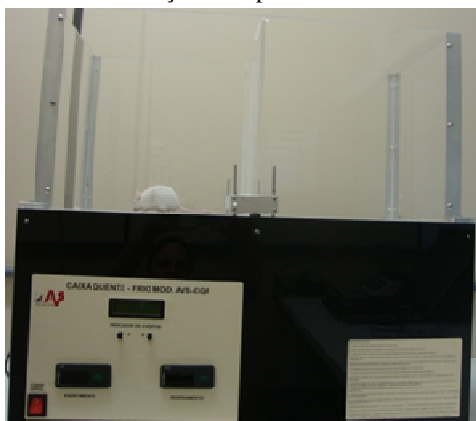
Fonte: <http://www.lintoninst.co.uk> em 05 de março de 2013.

4.4.1.8 Avaliação da hipersensibilidade térmica ao frio após LPNC e tratamento com acupuntura manual no SP6.

Para avaliação da hipersensibilidade ao estímulo térmico ao frio foi utilizado o método da placa fria (CAIXA QUENTE-FRIO MOD, AVS CQF, São Paulo, Brasil) como previamente descrito por Bennett e Xie (1988), com modificações (Figura 12). Os animais foram ambientados sobre a superfície da placa a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) por 5 minutos/dia, dois dias antes do início das avaliações. No momento do teste os camundongos foram colocados individualmente sobre a placa fria (10 ± 1 °C) e contidos por um vidro ($25 \times 30 \times 30$ cm). A latência da primeira retirada, determinada pela agitação ou lambida da pata traseira direita foi considerada indicativo de nocicepção. O animal foi retirado da placa fria 2 minutos após o início do teste para evitar danos teciduais. A hipersensibilidade térmica ao frio foi avaliada antes da cirurgia para caracterização da resposta basal, sete dias após a cirurgia e no 1°, 3°, 5°, 7°, 9°, 12°, 14°, 16°, 19°, 21° e 23° dias após o primeiro tratamento.

Como já descrito nas avaliações anteriores, no sétimo dia após a cirurgia da LPNC, os animais foram avaliados na placa fria e distribuídos homogeneamente em grupos; no mesmo dia, iniciou-se o tratamento com acupuntura no acuponto SP6 e no NA. Os animais dos grupos SP6 e NA foram tratados três vezes por semana, por 10 minutos, sendo que transcorrido o tempo de 15 minutos após a retirada da agulha, os animais foram avaliados em dias intercalados até 21 dias após o início dos tratamentos.

Figura 12: Foto de um camundongo sobre a Placa Fria (AVS-CQF, São Paulo, Brasil), usada na avaliação da hipersensibilidade térmica ao frio.



Fonte: foto de equipamento do LANDI.

4.4.2 Resultados

4.4.2.1 Padronização da acupuntura manual no acuponto SP6

4.4.2.1.1 Efeito do pré-tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 sobre o modelo de nocicepção induzido pelo ácido acético

Primeiramente, foram realizados testes em nosso laboratório: aplicando a agulha no acuponto SP6 na pata direita; manipulando a agulha; deixando a agulha por 15 minutos; retirando-a; injetando ácido acético intraperitoneal e avaliando os animais em 20 minutos. Foi observado que os animais tratados com acupuntura apresentaram um número menor de contorções abdominais quando comparados aos animais controle (que receberam ácido acético, porém sem tratamento prévio). Uma vez averiguada a efetividade da acupuntura nesse modelo experimental, foi padronizado o tratamento com acupuntura manual no ponto SP6 para que fosse possível observar o tempo de melhor efetividade deste acuponto.

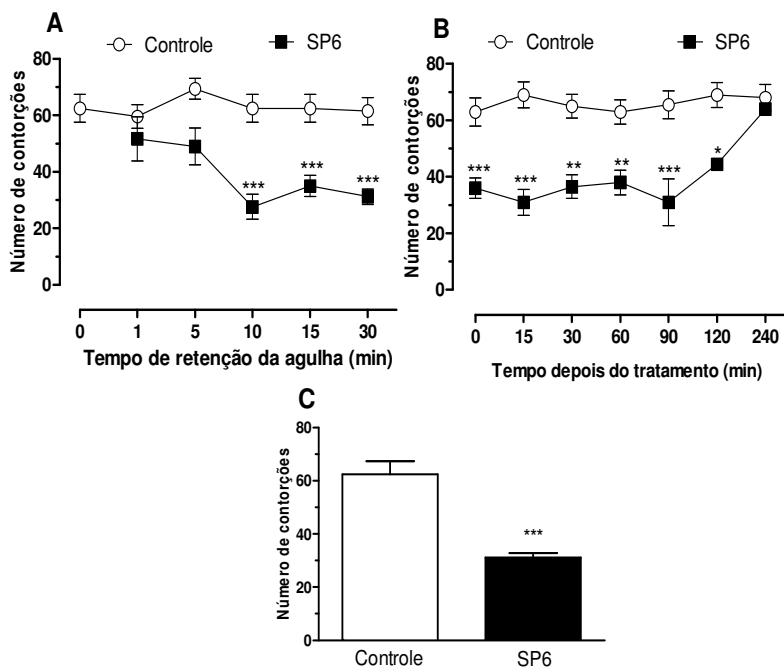
Pode-se observar na Figura 13 A, que os animais do grupo controle (que receberam ácido acético intraperitoneal sem tratamento prévio) apresentam um número significativo de contorções abdominais

em 20 minutos de avaliação. O número de contorções dos grupos tratados (SP6) foi comparado ao número de contorções dos grupos controles em cada ponto dos gráficos (que indica o período analisado) (Figura 13A e B), e a redução significativa dessas contorções é indicativo de antinocicepção. Inicialmente, foi avaliado o tempo de retenção da agulha nos grupos tratados com acupuntura no SP6, para verificar o efeito antinociceptivo dessa estimulação. Neste momento, observou-se que o SP6 foi efetivo em 10, 15 e 30 minutos com a permanência da agulha, sendo que a inibição máxima do número de contorções foi obtida com 10 minutos (inibição de $48 \pm 5\%$ à $56 \pm 7\%$) (Figura 13A). É importante salientar que a acupuntura manual foi realizada anteriormente a injeção de ácido acético, sendo assim, foi realizado um pré-tratamento com acupuntura, onde ela foi capaz de reduzir o número de contorções induzidas pelo agente flogístico.

Para determinar a duração do efeito antinociceptivo da estimulação com acupuntura no SP6, ou seja, para avaliar por quanto tempo, após o tratamento, o efeito antinociceptivo do SP6 permaneceria, seis grupos de camundongos foram tratados com retenção da agulha por 10 minutos. De zero a quatro horas após o tratamento com acupuntura, o ácido acético foi injetado via intraperitoneal nos animais. A atividade antinociceptiva do SP6 foi observada em 0 até 120 minutos (inibição de $27 \pm 2\%$ até $59 \pm 7\%$) (Figura 13B), sendo que seu efeito foi completamente extinto após 240 minutos do tratamento da acupuntura.

Na Figura 13C, pode-se observar o efeito antinociceptivo da acupuntura manual realizada no acuponto SP6 no melhor tempo de permanência, ou retenção da agulha, que foi de 10 minutos e também no tempo após a retirada da agulha que a acupuntura teve um efeito mais proeminente, que foi 15 minutos após a remoção da agulha.

Figura 13: Efeito antinociceptivo do acuponto SP6 em camundongos submetidos ao modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.



Efeito da retenção da agulha no ponto SP6 nos tempos de 1, 5, 10, 15 e 30 minutos de estimulação (■) (A). Os camundongos foram tratados com acupuntura manual no ponto SP6 (■) (10 minutos de retenção da agulha) e depois de 0, 15, 30, 60, 90, 120 ou 240 minutos receberam uma injeção de ácido acético (B). Em (C) está demonstrado o efeito da acupuntura manual no SP6 (coluna preta), com 10 minutos de retenção da agulha, que receberam ácido acético 15 minutos depois do tratamento. Cada ponto ou coluna representa a média de 6-8 animais e a barra vertical indica o E.P.M. (erro padrão da média). Os valores do Controle (○ ou coluna branca) indicam o número de contorção dos animais contidos sem acupuntura. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparados com os grupos controle, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$. A estatística realizada foi ANOVA de duas vias, seguida de teste post hoc de Bonferroni (A, B) e ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls (C).

Verificou-se também que o efeito antinociceptivo da acupuntura no SP6 não foi modificado pela recolocação da agulha no SP6 em

momentos em que, por ventura, os animais a retiravam ou ela caía. Assim, foi observado que a inserção da agulha, por mais de uma vez, não compromete o tratamento e o efeito da acupuntura. Esse experimento foi importante e permitiu observar que não ocorreu diferença estatística no efeito antinociceptivo causado pelo acuponto SP6 quando houve necessidade de recolocar a agulha no camundongo; portanto, a partir desse momento, quando algum animal retirava a agulha, a mesma era recolocada, e o procedimento continuava a ser executado (dados não apresentados).

Em outro momento, foi observado que o tratamento com o SP6 foi eficaz em diminuir a nocicepção induzida por ácido acético quando a agulha foi inserida unilateralmente (pata direita ou esquerda) ou bilateralmente, sem diferença estatística entre os grupos (Figura 14A).

4.4.2.1.2 Efeito do pré-tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 sobre o modelo de nocicepção induzida pela formalina

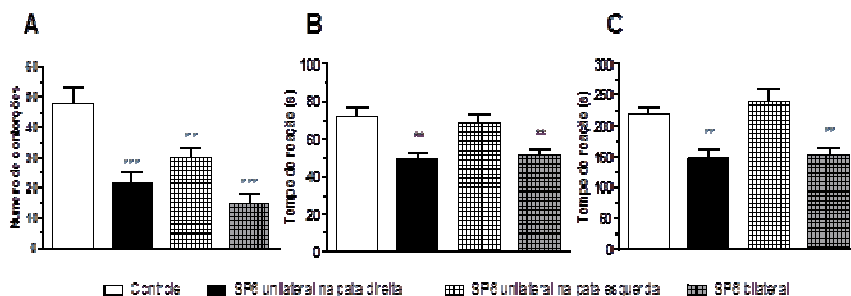
Além disso, foi investigado o efeito da estimulação com acupuntura em outro modelo de nocicepção aguda (injeção de formalina intraplantar). Nas Figuras 14B e C, observa-se que os animais do grupo controle (que não receberam tratamento antes da injeção de formalina), apresentam um tempo de reação significativo, tanto na 1ª quanto na 2ª fase da formalina, ou seja, os animais despenderam um tempo significativo lambendo e/mordendo a pata injetada (pata direita). Nota-se também, que o tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6, na pata direita (coluna preta da Figura 14), foi capaz de reduzir esse comportamento na 1ª. fase (Figura 14B) e na 2ª. fase (Figura 14C), indicando efeito antinociceptivo da acupuntura nesse modelo de nocicepção aguda com o mesmo tipo de tratamento padronizado no modelo do ácido acético.

Em ambos os modelos de nocicepção aguda utilizados neste trabalho, a acupuntura manual foi realizada anteriormente ao agente flogístico, ou seja, foi realizado um tratamento preventivo, na qual a acupuntura foi capaz de reduzir o número de contorções induzidas pelo ácido acético (Figura 14A) e também o tempo de reação (lambida e/modida da pata) induzido pela formalina (Figura 14B e C).

Como mencionado anteriormente, quando a agulha foi inserida unilateralmente, em qualquer uma das patas posteriores (direita e esquerda) ou quando a agulha foi inserida bilateralmente, a acupuntura manual realizada no acuponto SP6 apresentou efeito antinociceptivo

frente ao estímulo com ácido acético (Figura 14A). No entanto, apenas o tratamento unilateral na pata direita (ipsilateral à injeção de formalina), bem como o tratamento bilateral no acuponto SP6, reduziram a nocicepção induzida pela formalina. O tratamento com acupuntura manual realizada no acuponto SP6 localizado na pata contralateral à injeção da formalina, ou seja, na pata esquerda, não reduziu a nocicepção (Figura 14B e C).

Figura 14. Estimulação do acuponto SP6 induz efeito antinociceptivo somente quando a agulha é inserida ipsilateralmente à lesão.



(A) Efeito da acupuntura unilateral ou bilateral no ponto SP6, no modelo de nocicepção visceral induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%) em camundongos. (B) Efeito do tratamento unilateral ou bilateral com acupuntura manual no SP6, na primeira fase e (C) segunda fase, no modelo da formalina 2,5 %, em camundongos. Os valores do Controle (coluna branca) indicam a resposta nociceptiva dos animais contidos sem acupuntura. Cada ponto representa a média de 6-8 animais e a barra vertical indica o E.P.M. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparados com os grupos controle, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$. A estatística realizada foi ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls.

4.4.2.2 Envolvimento de fibras nervosas periféricas na antinocicepção causada pelo tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6

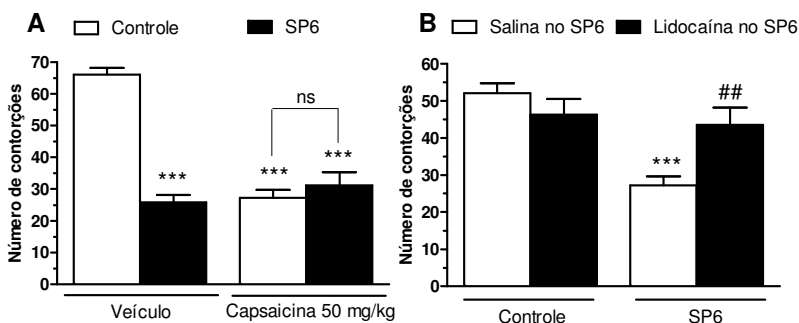
O sucesso do tratamento neonatal com capsaicina foi confirmado pela redução no número de resposta à capsaicina (coçar o olho) após sua aplicação tópica na córnea dos camundongos. Estes apresentaram um número reduzido de movimentos (dois meses depois da injeção de capsaicina subcutânea) em comparação aos animais que receberam

veículo no segundo dia após o nascimento. O número médio de movimentos de coçar o olho foi de $6,2 \pm 2,1$ e $23,4 \pm 1,2$ segundos em animais tratados com capsaicina ou veículo, respectivamente. Os animais que receberam capsaicina neonatal tiveram diminuição parcial das contorções abdominais que foram induzidas pelo ácido acético, comparado ao grupo que recebeu o tratamento neonatal com veículo, pelo fato de terem menos fibras nociceptivas.

O grupo de animais que recebeu veículo neonatal e foi tratado com acupuntura manual no acuponto SP6 antes da injeção de ácido acético, apresentou redução do número de contorções abdominais. Entretanto, os animais que receberam capsaicina neonatal e foram tratados com acupuntura no SP6, antes do ácido acético, não apresentaram redução do número de contorções abdominais (Figura 15A). Pode-se observar que os grupos de animais que receberam capsaicina neonatal, tratados ou não com acupuntura antes da injeção do agente flogístico, não apresentaram diferença estatística entre eles (Figura 15A).

Ademais, a injeção de lidocaína (1%) no local anatômico do acuponto SP6, antes do tratamento com acupuntura manual, impediu o efeito antinociceptivo da acupuntura manual realizada no acuponto SP6, em animais submetidos ao modelo de nocicepção induzido por ácido acético. Do contrário, o grupo de animais que recebeu salina no ponto de acupuntura (SP6), antes do tratamento com acupuntura manual, apresentou redução do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (Figura 15B).

Figura 15: Envolvimento de fibras nervosas periféricas na antinocicepção causada pelo tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6.



(A) Efeito do pré-tratamento com acupuntura no acuponto SP6 nos animais que receberam capsaicina ou veículo no período neonatal e foram posteriormente submetidos à algesia induzida por ácido acético. (B) Animais tratados com salina ou lidocaína no local do ponto SP6 antes do tratamento com acupuntura manual (agulha), e submetidos ao teste de nocicepção induzido por ácido acético. Cada ponto representa a média de 6-8 animais e a barra indica o E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparados com os grupos controle (A) e/ou salina no SP6 (B), *** $P < 0,001$. ## $P < 0,01$ representa a comparação com o grupo que recebeu lidocaína no local do SP6, mas não recebeu tratamento com acupuntura (controle, coluna preta). A estatística realizada foi ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls.

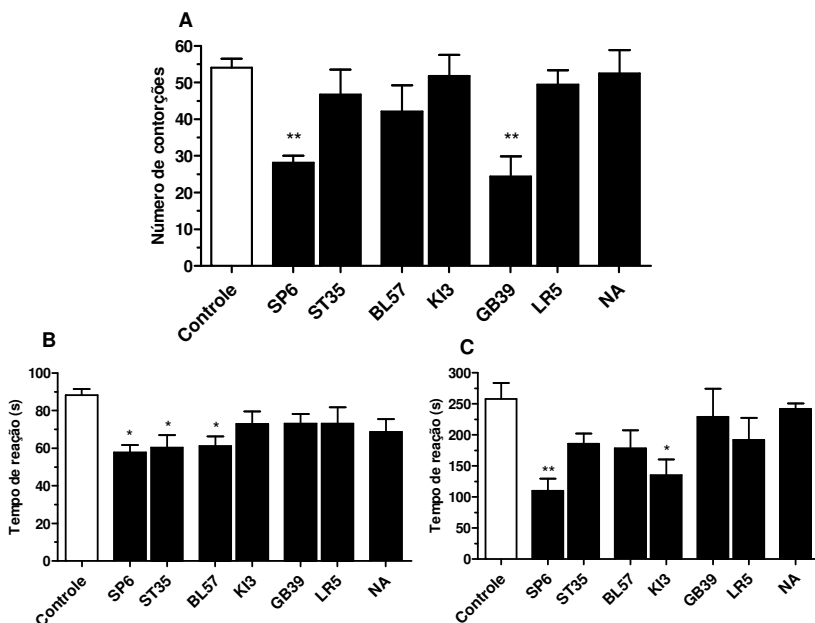
4.4.2.3 Efeito da acupuntura em diferentes acupontos apresenta diferenças nos mesmos modelos de nocicepção aguda

Os resultados apresentados na Figura 16A demonstraram que o pré-tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 e no acuponto GB39 reduziu de forma significativa o número de contorções abdominais nesses animais, comparando-se ao grupo controle, com inibição de $54 \pm 6 \%$ e $56 \pm 10 \%$, respectivamente (Figura 16A). Entretanto, o pré-tratamento com acupuntura manual nos acupontos ST35, BL57, KI3, e LR5 não foi capaz de reduzir o número de

contorções abdominais, bem como, a inserção da agulha no NA (não-acuponto) (Figura 16A).

Por outro lado, foi observado que o pré-tratamento com acupuntura nos acupontos SP6, ST35 e BL57 foi capaz de reduzir o comportamento de lambida e/ou mordida da pata nos animais submetidos ao teste da formalina, na fase neurogênica (primeira fase), com inibições de $32 \pm 5 \%$, $29 \pm 8 \%$ e $24 \pm 6 \%$, respectivamente (Figura 16B). Em adição, a estimulação dos acupontos SP6 e KI3 reduziram o tempo de resposta dos animais, frente à formalina, na fase inflamatória (segunda fase), com inibições de $55 \pm 8 \%$ e $44 \pm 10 \%$, respectivamente (Figura 16C). Por outro lado, o tratamento com acupuntura manual nos acupontos GB39, LR5 e no NA não foi capaz de alterar a resposta nociceptiva dos animais ao teste da formalina. Estes resultados mostram claramente que a estimulação individual de alguns pontos de acupuntura causou antinocicepção, porém, nem todos os acupontos possuem efeitos antinociceptivos (Figura 16B e C). Somado a isso, o agulhamento em um local em que não existe ponto de acupuntura (NA) não alterou a resposta nociceptiva dos animais em ambos os modelos de nocicepção aguda utilizados neste trabalho (Figura 16A, B e C).

Figura 16: Efeito do tratamento com acupuntura nos acupontos SP6, ST35, BL57, KI3, GB39, LR5 e no não acuponto (NA), nos modelos de nocicepção induzidos por ácido acético ou formalina em camundongos.



(A) Representa o efeito antinociceptivo do SP6 e GB39 no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. (B) Efeito da estimulação dos pontos SP6, ST35 e BL57 sobre o tempo de lambida/mordida da pata na primeira fase da formalina. (C) Efeito da estimulação dos pontos SP6 e KI3 sobre o tempo de reação dos animais na segunda fase da formalina. Cada ponto representa a média de 6-8 animais e a barra vertical indica o E.P.M. Os valores do Controle (coluna branca) indicam o valor de contorções abdominais dos animais contidos, porém que não receberam o tratamento com acupuntura. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparados com os grupos controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. A estatística realizada foi ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls.

4.4.2.4 Acupuntura no acuponto SP6 reduz hipersensibilidade mecânica em animais submetidos à LPNC (ligadura parcial do nervo ciático)

Nesta etapa, foi avaliado o efeito da estimulação do acuponto SP6 sobre o modelo de nocicepção crônica induzido pela LPNC. Os resultados apresentados na Figura 17 demonstram que sete dias após a cirurgia todos os animais operados apresentaram diminuição do limiar nociceptivo mecânico, ou seja, apresentaram hipersensibilidade frente aos estímulos com os filamentos de von Frey. Observou-se também que um único tratamento com o acuponto SP6 reduziu significativamente a hipersensibilidade mecânica nos animais operados (grupo SP6) (Figura 17A), sendo que este efeito permaneceu até 1 hora depois do tratamento (Figura 17A). Tendo em vista este resultado, as avaliações nos dias seguintes foram realizadas no mesmo período, e o efeito da acupuntura foi mantido de forma significativa e uniforme (Figura 17C).

No 10º dia após o início das avaliações (5º tratamento com acupuntura), foi realizada uma nova avaliação de duração do efeito antinociceptivo da acupuntura, onde se observou que a estimulação manual no acuponto SP6 foi efetiva em reduzir a hipersensibilidade mecânica; contudo, é importante destacar que a duração do seu efeito foi grandemente aumentado, ou seja, passou de 1 hora para até 6 horas após a retirada da agulha (Figura 17B).

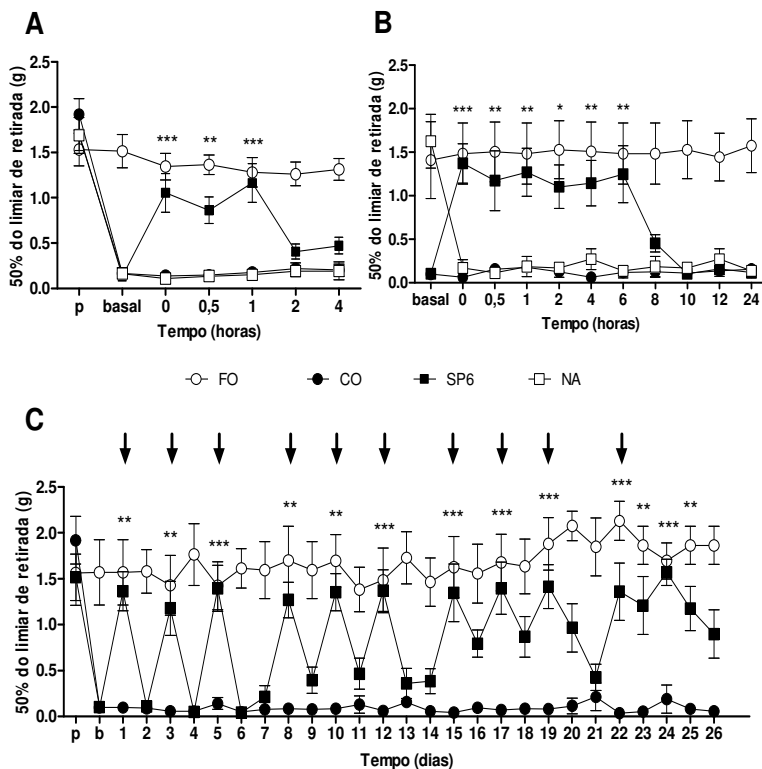
O efeito antinociceptivo da estimulação com agulha no acuponto SP6 foi avaliado ao longo de 26 dias. No início, observou-se efeito antinociceptivo com a acupuntura apenas nos dias em que foi realizado o tratamento (Figura 17C). Interessantemente, nota-se que após o quarto tratamento, o limiar de retirada da pata, dos animais que receberam acupuntura, não volta aos valores basais nos dias que os animais não receberam tratamento com acupuntura no SP6 (Figura 17C). Após o 10º tratamento (22º dia de avaliação), o efeito antinociceptivo da acupuntura perdurou por mais de 24 horas após a retirada da agulha. Quando o tratamento foi interrompido, continuaram-se a realização das avaliações e foi observado que o efeito antinociceptivo da acupuntura manual apresentou importante mudança na duração do seu efeito, ou seja, foi aumentado gradualmente o tempo do efeito antinociceptivo da

acupuntura e este efeito permaneceu por mais três dias após o último tratamento (Figura 17C).

4.4.2.5 Acupuntura no acuponto SP6 reduz hipersensibilidade térmica ao calor em animais submetidos à LPNC

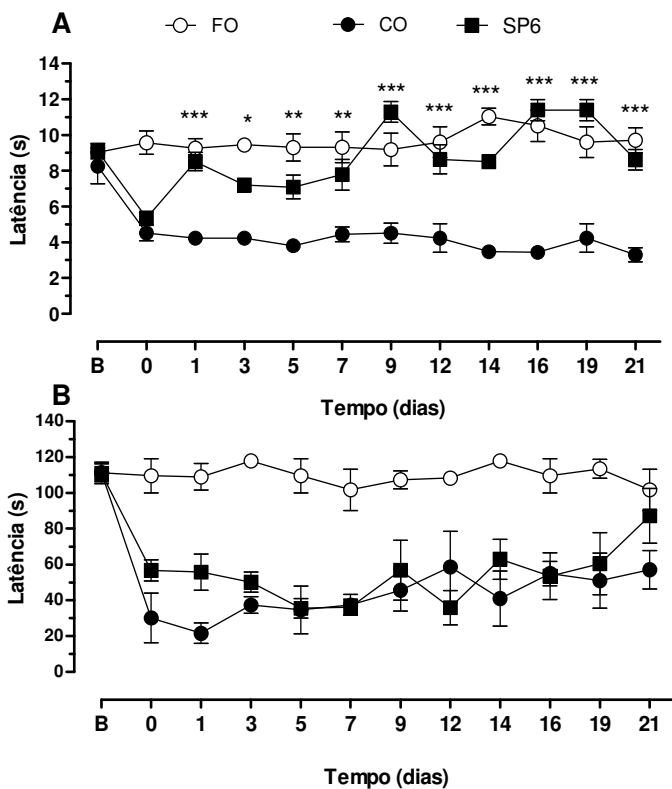
Os resultados descritos na figura 18 A e B mostram que o grupo submetido à LPNC apresentou hipersensibilidade térmica ao calor e ao frio, quando avaliado no Hargreaves e na placa fria, respectivamente. O tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 diminuiu significativamente a hipersensibilidade térmica ao calor, ao longo de 21 dias, avaliando-se 1 hora após a retirada da agulha (Figura 18A). Contudo, a estimulação com agulha no SP6 não interferiu na hipersensibilidade térmica ao frio em nenhum dos dias avaliados (Figura 18B).

Figura 17: Efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 na hipersensibilidade mecânica induzida pela LPNC em camundongos.



Efeito antinociceptivo da acupuntura realizada no SP6 em um (1) tratamento (A), em cinco (5) tratamentos (B) e ao longo de 26 dias, dez (10) tratamentos (C). Em todas as figuras os círculos abertos representam o grupo falso operado (FO - \circ), os círculos fechados representam o grupo operado (CO - \bullet), os quadrados abertos representam o grupo operado e tratado com não-acuponto (NA - \square) e os quadrados fechados representam o grupo operado tratado com o SP6 (SP6 - \blacksquare). Na Figura C, as setas indicam os dias de tratamento com acupuntura, foi removido o grupo NA do gráfico para uma melhor visualização, porém ele foi mantido na realização da estatística. A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA de duas vias) seguida do teste de Bonferroni. Cada ponto representa a média de 6-8 animais e a barra vertical indica o S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$, representa a diferença entre o grupo operado (CO - \bullet) e o tratado com acupuntura (SP6 - \blacksquare). A estatística realizada foi ANOVA de duas vias, seguida de teste post hoc de Bonferroni.

Figura 18 – Efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 na hipersensibilidade térmica ao calor e ao frio induzida pela LPNC em camundongos.



(A) Demonstra o efeito antinociceptivo do SP6 na hipersensibilidade térmica ao calor – Hargreaves. (B) Demonstra os efeitos do tratamento com acupuntura manual no SP6 na hipersensibilidade térmica ao frio – Placa fria. Em todas as figuras os círculos abertos representam o grupo falso operado (FO - ○), os círculos fechados representam o grupo operado (CO - ●) e os quadrados fechados representam o grupo operado tratado com o SP6 (SP6 - ■). O grupo tratado com o NA não foi efetivo em ambas as avaliações e foi retirado do gráfico para melhor observação dos resultados, mas não da realização da estatística. A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA de duas vias) seguida do teste de Bonferroni. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$, representa a diferença entre o grupo CO e o SP6. A estatística realizada foi ANOVA de duas vias, seguida de teste post hoc de Bonferroni.

4.5 PARTE II: ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO

4.5.1 Metodologia

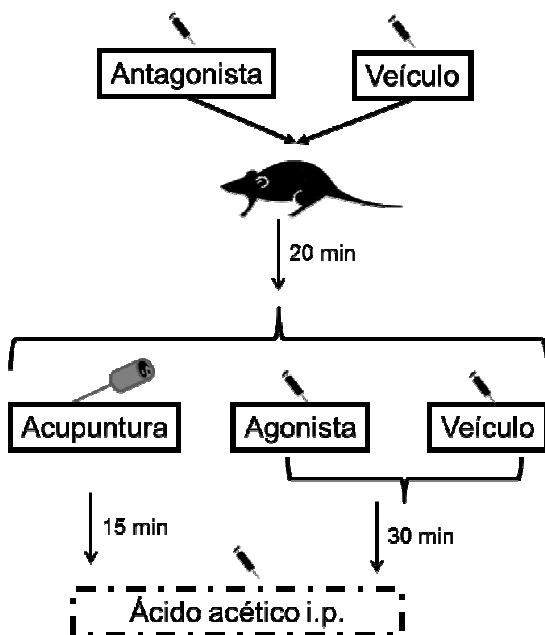
4.5.1.1 Avaliação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos no efeito antinociceptivo da acupuntura realizada no acuponto SP6

No intuito de avaliar algumas das possíveis vias endógenas pelas quais a acupuntura, realizada apenas no acuponto SP6, exerce seu efeito antinociceptivo, no presente estudo procurou-se avaliar o buscou-se o envolvimento dos seguintes sistemas: opióide, colinérgico, dopaminérgico, serotoninérgico, adrenérgico e adenosinérgico. Para esta avaliação, foram utilizadas ferramentas farmacológicas através do uso de agonistas e antagonistas seletivos dos receptores de cada um dos sistemas em estudo, sendo que esta etapa foi também avaliada através da nocicepção induzida pela injeção via intraperitoneal de ácido acético. Todas as doses de agonistas ou antagonistas utilizadas foram previamente descritas na literatura (SANTOS et al, 2005; NASCIMENTO et al, 2010) ou testadas através de estudos preliminares em nosso laboratório (LANDI).

Os experimentos obedeceram às etapas: (1) os camundongos foram pré-tratados com o antagonista ou veículo (10 mL/kg, i.p.); e (2) após 20 minutos os animais foram tratados com acupuntura manual no acuponto SP6, com o agonista ou com veículo (10 mL/kg, i.p.); (3) Após a realização da acupuntura (15 minutos) ou da administração dos agonistas ou veículo (ambos 30 minutos), os animais receberam ácido acético (0,6%, 0,45 ml/animal, i.p.) e (4) foi contabilizado o número de contorções abdominais que os animais realizavam em 20 minutos (Figura 19).

Na literatura, muitos autores sugerem a participação de diferentes neurotransmissores na ação antinociceptiva ou analgésica da acupuntura (OKADA; KAWAKITA, 2009; CHO et al, 2006; ZHAO, 2008), por isso, avaliamos alguns deles como descrito a seguir.

Figura 19: Esquema de tratamentos com os antagonistas e agonistas para avaliar os efeitos neurobiológicos da acupuntura realizada no acuponto SP6.



4.5.1.1.1 Participação de receptores opióides

Os camundongos foram pré-tratados pela via intraperitoneal com naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides) nas doses de 1 mg/kg, 3 mg/kg ou 10 mg/kg ou veículo (10 ml/kg, utilizado para diluir a naloxona) e após 20 minutos os animais foram tratados com acupuntura ou morfina (agonista não seletivo de receptores opióides) na dose de 1 mg/kg (via s.c.) ou veículo (via s.c.). A resposta nociceptiva ao ácido acético foi avaliada 15 minutos após a acupuntura e 30 minutos após a administração de morfina ou veículo, respectivamente.

Em outra série de experimentos, os camundongos foram pré-tratados com nor-BNI (antagonista opióide com alta seletividade para receptor κ opióide, 5 mg/kg, i.p.), naltrindole (antagonista opióide com alta seletividade para receptor δ opióide, 3 mg/kg, i.p.) ou CTOP (antagonista opióide seletivo para receptor μ opióide, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.), e após 20 minutos os animais foram tratados

com acupuntura, morfina (1 mg/kg, s.c.) ou veículo (10 ml/kg, s.c.). A resposta nociceptiva ao ácido acético foi avaliada 15 minutos após a acupuntura e 30 minutos após a administração de morfina ou veículo, respectivamente.

4.5.1.1.2 Participação de receptores colinérgicos

Os camundongos foram pré-tratados com atropina (antagonista muscarínico não seletivo, 1 mg/kg, i.p.), mecamelamina (antagonista nicotínico $\alpha_2\beta_3$ seletivo, 2 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e após 20 minutos os animais foram tratados com acupuntura, pilocarpina (agonista muscarínico não seletivo, 3 mg/kg, i.p.) ou nicotina (agonista nicotínico não seletivo, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). A resposta nociceptiva ao ácido acético foi avaliada 15 minutos após a acupuntura e 30 minutos após a administração de pilocarpina, nicotina ou veículo, respectivamente.

4.5.1.1.3 Participação de receptor dopaminérgico

Os camundongos foram pré-tratados com sulpirida (antagonista do receptor D2, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.), e após 20 minutos os animais foram tratados com acupuntura, apomorfina (agonista não seletivo de receptor dopaminérgico, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). A resposta nociceptiva ao ácido acético foi avaliada 15 minutos após a acupuntura e 30 minutos após a administração de apomorfina ou veículo, respectivamente.

4.5.1.1.4 Participação de receptores serotoninérgicos

Os camundongos foram pré-tratados com pindolol (antagonista não seletivo 5-HT_{1A/B}, 0,1 mg/kg, i.p.) ou WAY 100635 (antagonista seletivo 5-HT_{1A}, 10 mg/kg, i.p.) ou cetanserina (antagonista seletivo 5-HT_{2A}, 10 mg/kg, i.p.) ou ondansetrona (antagonista seletivo 5-HT₃, 3 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). Após 20 minutos, os animais foram tratados com acupuntura ou bupiriona (agonista parcial do receptor 5-HT_{1A}, 5 mg/kg, i.p.) ou DOI (agonista seletivo do receptor 5-HT_{2A}, 1 mg/kg, i.p.) ou agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). A resposta nociceptiva ao ácido acético foi avaliada 15 minutos após a acupuntura e 30 minutos após a administração de bupiriona, DOI, agmatina ou veículo, respectivamente. Devido à falta de agonista

do receptor 5-HT₃, usamos a agmatina, que em estudos prévios em nosso laboratório teve seu efeito antinociceptivo abolido pela ondansetrona (SANTOS et al, 2005).

4.5.1.1.5 Participação de receptores adrenérgicos

Os camundongos foram pré-tratados com prazosina (antagonista seletivo α_1 , 0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.), e após 20 minutos, os animais foram tratados com acupuntura, fenilefrina (agonista seletivo α_1 , 10 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). A resposta nociceptiva ao ácido acético foi avaliada 15 minutos após a acupuntura e 30 minutos após a administração de fenilefrina ou veículo (i.p.), respectivamente. Outros grupos de camundongos foram pré-tratados com ioimbina (antagonista seletivo α_2 , 0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e após 30 minutos os animais foram tratados com acupuntura, clonidina (agonista seletivo α_2 , 0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). A resposta nociceptiva ao ácido acético foi avaliada 15 minutos após a acupuntura e 30 minutos após a administração de clonidina ou veículo, respectivamente.

4.5.1.1.6 Participação de receptores adenosinérgicos

Os camundongos foram pré-tratados com DPCPX (antagonista seletivo A1, 1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.), e após 20 minutos os animais foram tratados com acupuntura, CHA (agonista seletivo A1, 0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). Outro grupo de animais foi pré-tratado com DPCPX (10 μ g/20 μ l, no local anatômico do SP6) ou veículo (no local anatômico do SP6), e após 20 minutos os animais foram tratados com acupuntura, CHA (5 μ g/20 μ l, no local anatômico do SP6) ou veículo (no local anatômico do SP6). Em todos os grupos de animais a resposta nociceptiva ao ácido acético foi avaliada 15 minutos após a acupuntura e 30 minutos após a administração de CHA ou veículo, respectivamente.

4.5.1.2 Análise imunoistoquímica da ativação da proteína c-Fos em animais tratados com acupuntura no acuponto SP6

A proteína oncogênica (controle da divisão/diferenciação celular e tradução protéica) c-fos pode ser induzida em poucos minutos pela estimulação de um neurotransmissor; portanto, é chamada de proteína de gene imediato precoce. Como o produto de proteína de fos, c-Fos, pode formar um complexo com outra proteína oncogene, a Jun, e este complexo se liga a uma seqüência gênica específica, o sítio AP-1, que é reconhecido como essencial para a transcrição basal ou ativada de vários genes. Portanto, a c-Fos está envolvida em uma cascata de sinalização e transdução que liga eventos extracelulares para adaptações intracelulares. Alguns autores demonstraram que a expressão basal de c-Fos é muito baixa, e que estímulos diversos como a despolarização de neurônios por estresse, epilepsia e nocicepção podem induzir um aumento muito dramático de expressão de c-Fos em neurônios (GREENBERG; ZIFF; GREENE, 1986; RAUSCHER et al, 1988; NARANJO et al, 1991; MORGAN et al, 1987; HUNT; PINI; EVAN, 1987; GAO; JI, 2009).

Assim, a c-Fos tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta para o estudo da atividade neuronal, especialmente relacionada à nocicepção, como um marcador neuronal para testar a eficácia de analgésicos (TRAUB; STITT; GEBHART, 1995; KIM et al, 2006).

Neste trabalho, os animais não sofreram indução da dor, pois nosso intuito foi verificar apenas se o tratamento com acupuntura no SP6 era capaz de aumentar a atividade neuronal em áreas relacionadas à dor. Diferentemente do que é mais estudado na literatura, onde os autores buscam verificar se os possíveis analgésicos avaliados por eles diminuem a atividade da c-fos em núcleos envolvidos com a dor, núcleos estes que já apresentam maior atividade de c-fos devido ao estímulo nocivo (agente flogístico ou cirurgia) aplicado antes do tratamento com os analgésicos.

Para a imunoistoquímica foram usados quatro grupos de animais, como descritos a seguir:

- a) ***Naive***, animais que não receberam nenhum estímulo prévio;
- b) ***Controle contido***, animais que foram contidos cuidadosamente em um cilindro de polietileno com as patas traseiras para fora para simular o tratamento com agulha;

- c) **NA**, animais tratados com o falso ponto de acupuntura (não acuponto);
- d) **SP6**, animais tratados com acupuntura manual no ponto SP6.

Após os tratamentos, os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg), e após a indução da anestesia os seus abdômens foram abertos. Com o auxílio de uma pinça cirúrgica o esterno foi elevado, e com uma tesoura pontiaguda o diafragma foi perfurado rapidamente e as costelas cortadas, a fim de expor o coração e realizar a perfusão intracardíaca. O ventrículo esquerdo foi perfurado com uma agulha conectada a um cateter ligado a recipientes contendo uma solução 0,1 M tampão fosfato salina (PBS) ou paraformaldeído à 4% dissolvido em PBS (0,1 M, pH 7,4). Para coordenar a passagem dos líquidos, a agulha com o cateter possui um adaptador que nos permite escolher qual das soluções deve passar pela agulha e conseqüentemente para dentro do animal. O adaptador foi aberto somente após pequeno corte no átrio direito do animal, permitindo a passagem de PBS em uma quantidade suficiente para retirar o sangue dos tecidos do animal (\pm 250 ml). Em seguida, foi interrompida a passagem de PBS e permitida a passagem de paraformaldeído 4%, até os animais ficarem rígidos (\pm 500 ml).

O encéfalo foi removido imediatamente e pós-fixado com a mesma solução fixadora (paraformaldeído 4%) por 4 horas à temperatura ambiente. Os tecidos fixos foram imersos em sacarose 30% em PBS por 2 dias a 4°C para crioproteção. Logo após, foram seccionados (20 μ m) em criostato e incubados por 30 minutos com 6% peróxido de hidrogênio (H₂O₂), lavados duas vezes durante 10 minutos com PBS (0,1 M) contendo 5% de leite seco e incubadas com Triton X-100 (0,8%) dissolvido em PBS (0,1M) mais 0,5% de soro de albumina bovina (PBS + BSA).

Depois de uma breve lavagem, o tecido foi incubado durante a noite em temperatura ambiente com um anticorpo anti-c-Fos policlonal de coelho (anticorpo anti-c-Fos (AB-5) (4-17) RABBIT, CALBIOCHEM®) (1:1.000) diluído em PBS + BSA. Após lavagem com PBS, o tecido foi incubado com um anticorpo secundário biotinylation anti-coelho (anticorpo biotinylated anti-rabbit IgG, VECTOR®).

Para visualizar os neurônios marcados com o anticorpo para imunorreatividade à c-Fos (c-Fos+) nos núcleos, o tecido foi incubado com 0,05% HCl diaminobenzidina (DAB) e 0,003% H₂O₂. Após a reação com DAB, o tecido foi lavado com 0,1 M PBS, os cortes foram

colocados em um recipiente contendo PBS e retirados com lâminas gelatinizadas. Após a montagem das lâminas, foram coladas lamínulas em cima dos cortes e depositadas para secar.

As imagens foram avaliadas em microscópio (Nikon 80i Eclipse) com objetiva de 40x. Foram analisados: locus coeruleus (LC), substância cinzenta periaquedutal (PAG), núcleo magno da Rafe (Rafe), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), núcleo ventro postero lateral do tálamo (VPLn Tálamo), núcleo central da amígdala (ACe), hipocampo – áreas CA1, CA2, CA3, CA4 e giro denteado (GD). Todas as áreas foram avaliadas bilateralmente, e analisados cinco cortes por animal, usando como referência o *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Deluxe Edition), Second Edition, George Paxinos and Keith B.J. Franklin, 2001. A média com erro das células marcadas, por grupos, foi exposta em forma de tabela nos resultados.

4.5.2 Resultados

4.5.2.1 Envolvimento de sistemas endógenos no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6, na nocicepção induzida por ácido acético

Determinado o efeito antinociceptivo da acupuntura realizada no ponto SP6 em modelos de nocicepção aguda e crônica, procurou-se verificar se sistemas endógenos envolvidos no controle da dor estavam relacionados com o efeito antinociceptivo da estimulação por acupuntura manual.

4.5.2.1.1 Envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6

Os resultados apresentados na Figura 20A mostram que o tratamento com naloxona (antagonista não seletivo de receptor opióide), nas doses de 1, 3 e 10 mg/Kg, não apresentam efeito antinociceptivo, quando ela foi administrada antes do ácido acético, ou seja, o número de contorções dos animais que receberam apenas naloxona foi similar ao número de contorções dos animais do grupo controle (Figura 20A).

O agonista opióide, morfina, quando administrado antes da injeção intraperitoneal de ácido acético, foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais dos animais comparado aos camundongos do

grupo controle. Contudo, quando a naloxona (1, 3 e 10 mg/kg) foi administrada previamente a injeção de morfina (1 mg/kg), e posteriormente os animais foram submetidos ao ácido acético, não foi observado o efeito antinociceptivo do agonista opióide (Figura 20A). Este resultado mostra que o antagonista usado (naloxona) foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo do agonista (morfina), usado como um controle positivo.

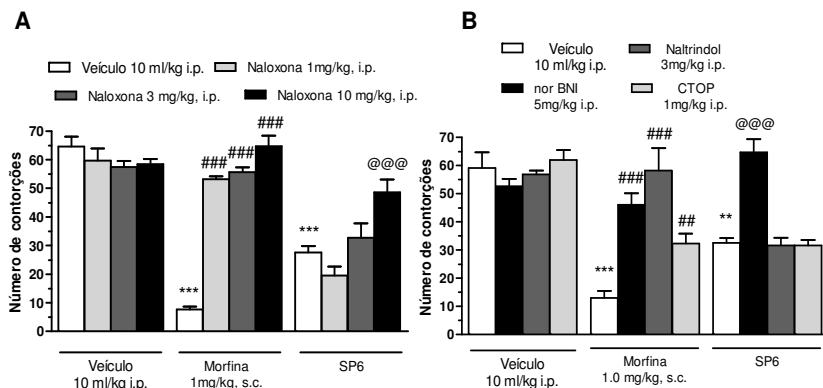
Chama-se a atenção também que o antagonista opióide, naloxona, preveniu o efeito antinociceptivo causado pelo pré-tratamento com acupuntura manual no SP6, apenas na dose mais alta (10 mg/Kg) (Figura 20A). Portanto, optou-se por utilizar também antagonistas específicos para cada um dos receptores opióides.

Todos os antagonistas opióides usados isoladamente (nor-BNI, naltrindol e CTOP), administrados antes da injeção de ácido acético, não modificaram o número de contorções dos camundongos comparados aos animais do grupo controle (Figura 20B). Além disso, os antagonistas foram capazes de prevenir o efeito antinociceptivo da morfina administrada antes de cada um deles (Figura 20B). Este efeito mostra que os antagonistas usados foram capazes de prevenir o efeito antinociceptivo do agonista (morfina), usado como um controle positivo.

O efeito antinociceptivo da acupuntura realizada no acuponto SP6, foi prevenido pelo antagonista seletivo para receptor Kappa opióide (Nor-BNI) (Figura 20B). Contudo os antagonistas μ e δ (naltrindol e CTOP), apesar de prevenirem o efeito da morfina, não foram capazes de abolir o efeito antinociceptivo da acupuntura (Figura 20B).

Assim, observa-se que doses menores de naloxona (Figura 20A) e antagonistas de receptores μ e δ opióide (Figura 20B), não foram capazes de prevenir o efeito antinociceptivo da acupuntura manual realizada no acuponto SP6.

Figura 20: Envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no SP6, no modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético.



(A) Animais submetidos à pré-administração de naloxona (antagonista opióide) mais tratamento com acupuntura manual no ponto SP6 ou com morfina. (B) Efeito do pré-tratamento de antagonistas opióide específicos CTOP (μ opióide), Naltrindole (Δ opióide) ou norBNI (κ opióide) mais acupuntura no SP6 ou tratamento com morfina. Cada ponto representa a média de 6-8 animais e a barra vertical indica o E.P.M. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparados com os grupos controle, $**P<0.01$ e $***P<0.001$. $##P<0.01$ e $###P<0.001$ comparando animais do grupo que recebeu agonista com animais do grupo que recebeu antagonista mais agonista. $@@@P<0.001$ comparando os grupos acupuntura no SP6 com o grupo antagonistas mais acupuntura no ponto SP6. A estatística realizada foi ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls.

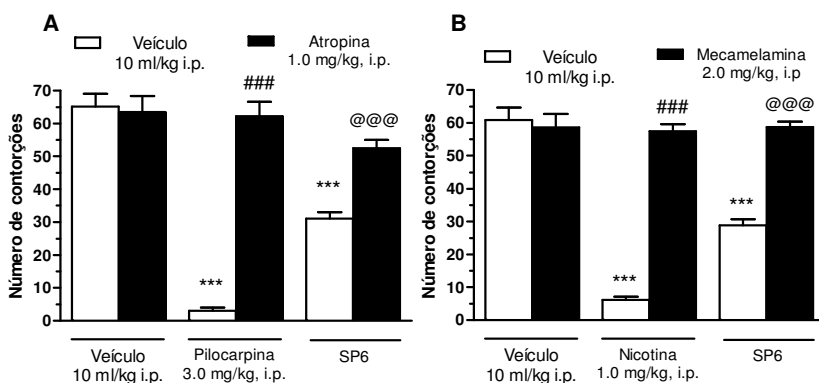
4.5.2.1.2 Envolvimento do sistema colinérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6

Verifica-se, nos resultados apresentados na Figura 21, que o antagonista colinérgico muscarínico, atropina (1 mg/kg), e o antagonista nicotínico, mecamelamina (2 mg/kg), quando administrados antes da injeção de ácido acético, não modificam o número de contorções abdominais dos animais tratados comparados aos animais do grupo controle. Também se pode observar que os agonistas administrados previamente ao ácido acético, pilocarpina (agonista muscarínico) e nicotina (agonista nicotínico), reduzem o número de contorções

abdominais comparados aos animais do grupo controle. Contudo, quando os antagonistas foram administrados antes da pilocarpina e da nicotina, eles foram capazes de prevenir o efeito antinociceptivo desses agonistas. Este resultado demonstra que os antagonistas usados foram capazes de prevenir o efeito antinociceptivo dos agonistas, usados como um controle positivo para os experimentos.

Além disso, os dados obtidos revelaram que o tratamento com os antagonistas de receptores colinérgicos, muscarínico (Figura 21A) e nicotínico (Figura 21B), preveniram o efeito antinociceptivo da acupuntura manual realizada no acuponto SP6.

Figura 21: Envolvimento do sistema colinérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no SP6, no modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético.



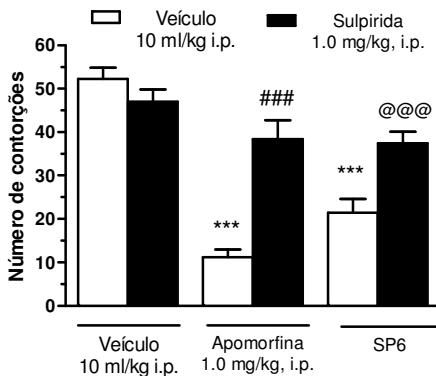
Efeito do pré-tratamento com mecamelamina (A) e a atropina (B) sobre a antinocicepção causada pela acupuntura manual no ponto SP6, e dos tratamentos com nicotina ou pilocarpina. Cada ponto representa a média de 6-8 animais e a barra vertical indica o E.P.M. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparados com os grupos controle, *** $P < 0.001$. ### $P < 0.001$ comparando animais do grupo que recebeu agonista com animais do grupo que recebeu antagonista mais agonista. @@@ $P < 0.001$ comparando os grupos acupuntura no SP6 com o grupo antagonista mais acupuntura no ponto SP6. A estatística realizada foi ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls.

4.5.2.1.3 Envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6

Observa-se que o antagonista dopaminérgico, sulpirida (1 mg/kg), não modificou o número de contorções abdominais dos animais comparados aos camundongos do grupo controle (Figura 22).

O agonista dopaminérgico apomorfina (1 mg/kg), administrado previamente ao ácido acético, reduziu o número de contorções abdominais comparados aos animais do grupo controle (Figura 22). Contudo, esse efeito antinociceptivo da apomorfina não se repetiu quando se administrou o sulpiride previamente (Figura 22), demonstrando que o antagonista utilizado foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo do agonista, usado como um controle positivo para os experimentos. A sulpirida foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6 (Figura 22).

Figura 22: Envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no SP6, no modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético.



Demonstra o efeito do sulpiride no efeito antinociceptivo da acupuntura no SP6 ou da apomorfina. Cada ponto representa a média de 6-8 animais e a barra vertical indica o E.P.M. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparados com os grupos controle, *** $P < 0.001$ ### $P < 0.001$ comparando animais do grupo que recebeu agonista com animais do grupo que recebeu antagonista mais agonista. @@@ $P < 0.001$ comparando os grupos acupuntura no SP6 com o grupo antagonista mais acupuntura no acuponto SP6. A estatística realizada foi ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls.

4.5.2.1.4 Envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6

Examinando os resultados apresentados na Figura 23A, nota-se que o antagonista adenosinérgico para o receptor A1, DPCPX, não interfere no número de contorções induzidas pelo ácido acético, quando foi administrado intraperitoneal, antes da injeção de ácido acético.

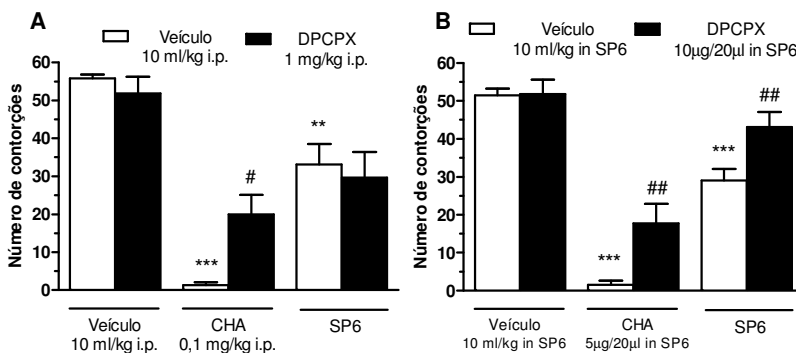
Verifica-se também que o agonista de receptores adenosinérgicos A1 (CHA), administrado intraperitonealmente, foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e que o DPCPX administrado previamente, impediu o efeito antinociceptivo do CHA (Figura 23A). Este resultado mostra que o antagonista utilizado foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo do agonista, usado como um controle positivo para os experimentos. Contudo, o DPCPX, administrado intraperitonealmente, não foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo do pré-tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 (Figura 23A).

Devido aos dados recentes encontrados em pesquisas sobre acupuntura (GOLDMAN et al, 2010), procurou-se verificar o efeito local do antagonista de receptor A1 adenosinérgico (DPCPX) sobre o efeito antinociceptivo da acupuntura manual. Quando se administrou o DPCPX no local do ponto de acupuntura SP6, ele não interferiu no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, comparando os dados dos animais do grupo controle.

O agonista adenosinérgico (CHA), administrado periféricamente, reduziu o número de contorções abdominais e esse efeito antinociceptivo foi prevenido quando administrou-se DPCPX periféricamente antes da injeção do agonista (Figura 23B). Este resultado mostra, mais uma vez, que o antagonista preveniu o efeito antinociceptivo do agonista (controle positivo).

Os presentes dados demonstram que o DPCPX administrado periféricamente, ou seja, quando foi injetado no local da inserção da agulha (local do SP6) foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo da acupuntura manual realizada no acuponto SP6 (Figura 21E). Esse resultado indica a importância dos receptores adenosinérgicos locais (no acuponto) na redução da nocicepção pela acupuntura manual.

Figura 23: Envolvimento do sistema adenosinérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no SP6, no modelo de nocicepção induzido por ácido acético.



(A) Efeito da acupuntura manual no SP6 e administração intraperitoneal de adenosina ou veículo em animais previamente tratados com veículo ou DPCPX. (B) Efeito da acupuntura manual no SP6 e administração periférica (no local do ponto SP6) de adenosina ou veículo em animais previamente tratados com veículo ou DPCPX. Cada ponto representa a média de 6-8 animais e a barra vertical indica o E.P.M. * denotam os níveis de significância, quando comparados com os grupos controle, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$. # representam os níveis de significância comparado aos grupos tratados com agonistas # $P < 0.05$ e ## $P < 0.01$. A estatística realizada foi ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls.

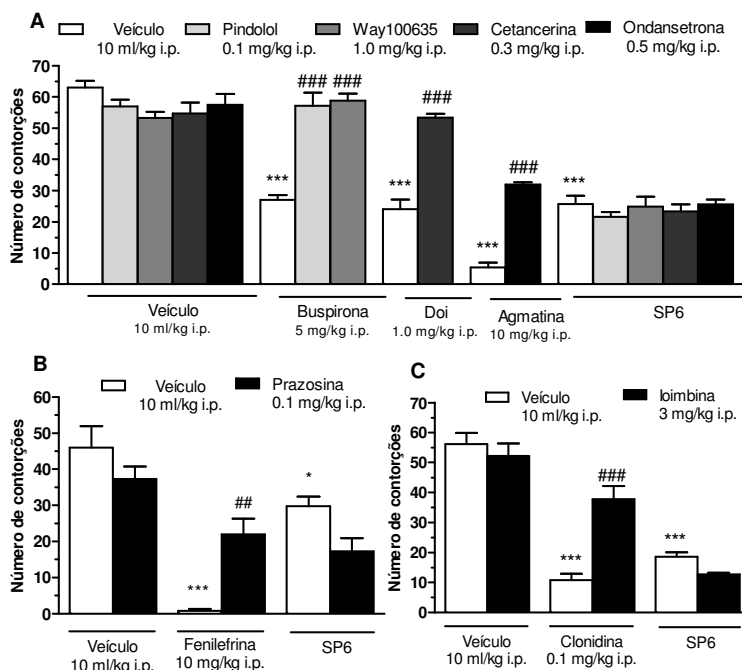
4.5.2.1.5 O sistema serotoninérgico e o adrenérgico não estão envolvidos no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6

Na Figura 24, pode-se observar que os antagonistas serotoninérgicos (5-HT_{1A/B} - pindolol, 5-HT_{1A} - Way 100635, 5-HT_{2A} - cetancerina e 5-HT₃ - ondansetrona) e os antagonistas adrenérgicos (α ₁ - prazosina e α ₂ - ioimbina) não modificaram o número de contorções abdominais dos animais submetidos à injeção de ácido acético. Contudo, foram capazes de prevenir o efeito antinociceptivo dos seus agonistas serotoninérgico (buspirona-agonista parcial do receptor 5-HT_{1A}, DOI-agonista seletivo do receptor 5-HT_{2A}, agmatina-substância usada como agonista 5HT-3 pela falta de um agonista específico) e

adrenérgicos (fenilefrina-agonista seletivo $\alpha 1$ e clonidina-agonista seletivo $\alpha 2$). Estes resultados mostram que todos os antagonistas utilizados foram capazes de prevenir o efeito antinociceptivo de seus agonistas. Esses grupos foram então usados como controle positivo para os experimentos.

Porém, apesar de prevenir o efeito antinociceptivo de seus agonistas, os antagonistas serotoninérgicos e adrenérgicos; não foram capazes de prevenir o efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6 (Figura 24A, B e C). Este resultado indica que não há participação de receptores serotoninérgicos 5-HT1A/B, 5-HT1A, 5-HT2A e 5-HT3, bem como de receptores $\alpha 1$ e $\alpha 2$ adrenérgicos, no efeito antinociceptivo da acupuntura manual realizada no acuponto SP6, pelo menos com os procedimentos utilizados neste trabalho.

Figura 24: Avaliação do sistema serotoninérgico e adrenérgico no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no SP6, no modelo de nocicepção induzido por ácido acético.



(A) Efeito do tratamento com acupuntura manual no SP6 e administração de fenilefrina, clonidina ou veículo em animais previamente tratados com prazosina, ioimbina ou veículo. (B e C) Efeito da acupuntura manual no ponto SP6 e do tratamento com buspirona, DOI, agmatina ou veículo em animais previamente tratados com veículo, pindolol, Way, cetancerina ou ondancetona. Cada ponto representa a média de 6-8 animais e a barra vertical indica o E.P.M. * denotam os níveis de significância, quando comparados com os grupos controle, * $P < 0.05$ e *** $P < 0.001$. # representam os níveis de significância comparado aos grupos tratados com agonistas ## $P < 0.01$ e ### $P < 0.001$. A estatística realizada foi ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls.

4.5.2.2 Efeito da acupuntura manual no SP6 na ativação da proteína c-Fos em áreas encefálicas, em animais que não foram expostos a modelos de nocicepção.

Nesta etapa foram observadas as consequências da estimulação com acupuntura no acuponto SP6, sobre áreas encefálicas que estão envolvidas no processamento, transmissão e modulação da dor. O efeito da acupuntura manual foi investigado sobre o Locus coeruleus (LC), a substância cinzenta periaquedutal (PAG), Rafe, o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), o núcleo ventro póstero lateral do tálamo (VPLn), a amígdala central (CeA) e o hipocampo (áreas CA1, CA2, CA3, CA4 e giro denteado – GD), através da técnica de imunohistoquímica para cFos, um marcador de atividade neuronal.

Os dados apresentados na Tabela 2 demonstram que a estimulação manual do acuponto SP6 resultou no aumento da expressão de cFos em diferentes núcleos e áreas centrais em comparação com o grupo Naive, sendo que o aumento em porcentagem dessa marcação foi: LC (26,8 %), PAG (100 %), Rafe (36,3 %), PVN (56,0 %), CeA (69,8 %), CA1 (43,6 %), CA2 (55,2 %), CA3 (41,2 %), CA4 (84,6 %) e GD (35,2 %) (Tabela 2). Os grupos experimentais SP6 e NA apresentaram diferenças estatísticas na quantidade de células marcadas para cFos em todas as áreas centrais avaliadas, com exceção do Tálamo VPLn onde não houve diferença entre os grupos. Além disto, a atividade de cFos foi similar entre os grupos de animais controle contido e NA (tratados com não-acuponto) e ambos os grupos não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo Naive (Tabela 2).

Tabela 2: Número de células positivas para cFos em animais Naive, Controle contido, NA e SP6.

Área Central	Naive	Controle contido	NA	SP6
LC	20,85 ± 0,56	18,55 ± 1,69	20,00 ± 1,08	26,45 ± 2,56*
PAG	22,76 ± 2,28	25,40 ± 0,75	31,00 ± 2,31	45,53 ± 2,98***
Rafe	10,05 ± 0,83	9,75 ± 0,72	10,25 ± 0,78	13,70 ± 0,91*
PVN	20,90 ± 2,07	25,13 ± 1,90	22,69 ± 1,89	32,61 ± 1,56**
Tálamo VPLn	24,23 ± 1,07	16,20 ± 1,98	15,75 ± 2,17	21,78 ± 3,08
Amígdala central	9,40 ± 2,39	6,82 ± 0,35	8,19 ± 1,83	15,96 ± 1,03*
Hipocampo				
CA1	15,14 ± 0,95	10,98 ± 1,71	9,77 ± 0,64	21,75 ± 3,95*
CA2	10,08 ± 0,67	9,275 ± 0,61	10,25 ± 1,25	15,65 ± 0,79**
CA3	9,70 ± 0,35	8,62 ± 0,91	9,57 ± 0,84	13,70 ± 1,21**
CA4	8,18 ± 0,52	7,75 ± 0,73	8,40 ± 0,80	15,10 ± 1,08***
GD	17,18 ± 1,95	14,05 ± 1,41	13,98 ± 0,90	23,23 ± 1,23*

A análise foi realizada no locus coeruleus (LC), substância cinzenta periaquedutal (PAG), núcleo magno da Rafe (Rafe), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), tálamo ventro pósterolateral (Tálamo VPLn), amígdala central (Amígdala CeA) e hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4 e giro denteado - GD). Cada ponto representa a média de 4-5 animais e o + indica o erro. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparados com o grupo naive, *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001. A estatística realizada foi ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls.

4.6 PARTE III: EFEITO DA ACUPUNTURA NA PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA

4.6.1 Metodologia

4.6.1.1 Indução da peritonite

Para estudar o efeito anti-inflamatório da acupuntura manual no acuponto SP6, foi utilizado um modelo de peritonite induzida por carragenina. A inflamação no peritônio (membrana serosa, que cobre as paredes abdominais e a superfície inferior do diafragma) foi induzida através da injeção intraperitoneal de 0,5 ml de carragenina (750 µg por cavidade) diluída em solução salina estéril, de acordo com

procedimentos descritos anteriormente por Pagano e colaboradores (2002). A injeção de carragenina é capaz de aumentar o número de células inflamatórias e sinais da inflamação localmente, sendo portanto um modelo utilizado para investigar possíveis tratamentos anti-inflamatórios (PAGANO et al, 2002; MOREAU et al, 2005).

Na realização desta etapa de experimentos foram usados diferentes grupos experimentais:

a) Salina, animais que receberam salina intraperitoneal (salina estéril, 10 ml/kg, i.p.).Esse grupo de animais não recebeu o agente flogístico (grupo S) e sim um volume similar de veículo (salina estéril, 10 ml/kg, i.p.) e foi utilizado para mensurar células, exsudato, e todos os parâmetros avaliados, além de verificar se os mesmos diferiam dos animais do grupo controle;

b) Controle, animais que receberam carragenina intraperitoneal (750 µg por cavidade).Esse grupo de camundongos recebeu carragenina intraperitoneal (750 µg por cavidade) e foi utilizado como controle (grupo C);

c) SP6, animais que foram tratados com acupuntura manual no acuponto SP6 (10 minutos de retenção da agulha) e logo após o tratamento os camundongos receberam carragenina intraperitoneal (750 µg por cavidade);

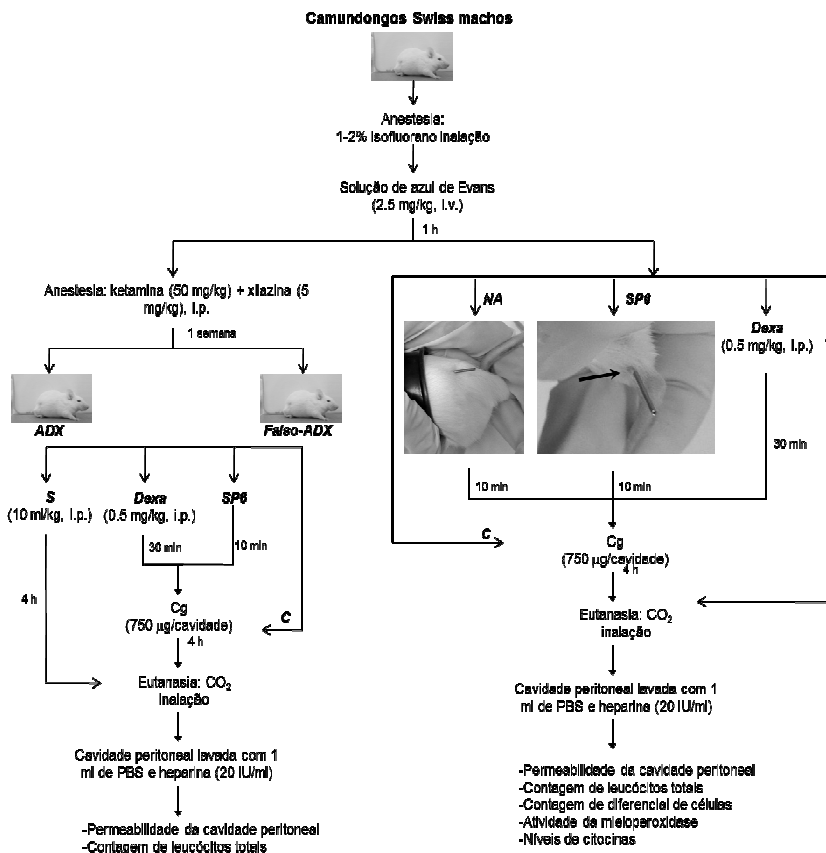
d) NA, animais tratados com o falso ponto de acupuntura (não acuponto) e logo após o tratamento os camundongos receberam carragenina intraperitoneal (750 µg por cavidade);

e) DEXA, animais tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), 30 minutos antes de receberem carragenina intraperitoneal (750 µg por cavidade). Os animais pré-tratados com dexametasona (grupo Dexa) foram utilizados como controle positivo. O glicocorticoide sintético dexametasona é utilizado no tratamento de doenças alérgicas e inflamatórias. Sua dose foi escolhida de acordo com dados da literatura (MONTANHER et al, 2007), e também com base em estudos anteriores de nosso laboratório.

Quatro horas após a injeção de carragenina ou de salina, os animais foram sacrificados por inalação de CO₂, de acordo com os cuidados básicos de animais experimentais. O exsudato peritoneal foi colhido nos animais de todos os grupos experimentais para posterior análise e contagem de leucócitos, avaliação da permeabilidade capilar peritoneal, avaliação da enzima mieloperoxidase e dos níveis de citocinas.

Para uma melhor observação de todos os grupos e procedimentos da parte II observar o Fluxograma abaixo (Figura 25).

Figura 25: Fluxograma dos procedimentos experimentais na indução e avaliação da peritonite induzida por carragenina.



Fonte: Adaptado de da Silva et al, 2011.

4.6.1.2 Contagem de leucócitos peritoneais

A cavidade peritoneal foi aberta e lavada com 1 ml de tampão fosfato estéril (PBS), contendo heparina (20 UI/ml). A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, após diluição do líquido peritoneal com solução de Türk (1:20). As células peritoneais foram citocentrifugadas em lâminas usando um Cytospin (Tharmac, Alemanha) e coradas com May-Grünwald Giemsa para contagem diferencial de leucócitos (PAGANO et al, 2002; MONTANHER et al, 2007).

4.6.1.3 Permeabilidade capilar peritoneal

Antes da injeção intraperitoneal de carragenina, os camundongos foram anestesiados por inalação de isoflurano (1-2%) e uma solução de corante azul de Evans (25 mg/kg), utilizado como marcador de permeabilidade capilar peritoneal, foi injetada por via intravenosa. Uma amostra do líquido coletado (500 µl) a partir do espaço peritoneal foi separado e armazenado em freezer (-20°C), para determinar a concentração de corante de azul de Evans. A quantidade de azul de Evans extravasado foi medida espectrofotometricamente a 620 nm. A permeabilidade capilar peritoneal induzida por carragenina foi expressa em termos de corante (mg/ml), que vazou na cavidade peritoneal por interpolação a partir da curva padrão de azul de Evans na faixa de 5-100 mg/ml (PAGANO et al, 2002; MONTANHER et al, 2007).

4.6.1.4 Ensaio de mieloperoxidase do fluido peritoneal

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no líquido peritoneal, um indicador da presença de neutrófilos, foi avaliado por 4 horas após a indução da peritonite pela carragenina em camundongos. O exsudado foi centrifugado a 20,000 x g por 30 minutos a 4 °C. Uma alíquota foi colocada para reagir com uma solução de HCl 1,6 mM tetrametilbenzidina em dimetilformamida e peróxido de hidrogênio 0,1 mM em placas 96-well. As placas foram incubadas a 37 °C por 3 minutos, e então a reação foi interrompida pela adição de acetato de sódio (1,46 M, pH 3,0). A atividade de MPO foi estimada por meio de medições colorimétricas usando um leitor de placas (BMG Labtec, Alemanha), definido como medida de absorbância a 650 nm, e expressos em DO/mL. As amostras de líquido peritoneal dos animais

controle e tratados com acupuntura foram coletadas e processadas imediatamente para analisar os níveis de MPO (FRÖDE; MEDEIROS; 2001).

4.6.1.5 Determinação dos níveis de citocinas do líquido peritoneal

Quatro horas após a indução da peritonite por carragenina, o líquido peritoneal dos camundongos foi usado para avaliar os níveis de citocinas por imunoensaio de enzima (ELISA). Alíquotas de 100 μ l foram usadas para medir os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 utilizando kits de ELISA de R & D Systems (Minneapolis, E.U.A.), de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância de todas as citocinas estudadas foi medida usando um leitor de microplacas a 450 nm e 550 nm (FRÖDE; MEDEIROS; 2001; MIZGERD; SPIEKER; DOERSCHUK, 2001).

4.6.1.6 Envolvimento das glândulas adrenais

A fim de investigar a participação das glândulas adrenais na atividade anti-inflamatória da acupuntura no ponto SP6, os camundongos foram anestesiados com xilasina (10 mg/kg) e cetamina (80 mg/Kg) e foi realizada adrenalectomia bilateral (ADX) através de uma incisão dorsal, como descrito anteriormente por Santos et al (1999). Os animais falso operados foram submetidos ao mesmo procedimento, contudo, não houve remoção das glândulas adrenais. Após a cirurgia, os animais foram devolvidos às suas caixas, com livre acesso à comida e bebida, mas a água foi substituída por solução salina (0,9% NaCl) nos animais ADX, para manter a concentração fisiológica de sódio no plasma. Após uma semana, os animais foram tratados com acupuntura no SP6, no falso ponto (não acuponto - NA) ou com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p. - DEXA). Os animais controle receberam um volume similar de veículo apropriado (Salina, 10 ml/kg, i.p.). Os animais foram sacrificados 4 horas após a injeção de carragenina, por inalação de CO₂, e a peritonite foi avaliada como descrito anteriormente.

4.6.2 Resultados

4.6.2.1 Efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 no modelo de peritonite induzida por carragenina

A injeção de carragenina na cavidade peritoneal de camundongos resultou em aumento significativo de leucócitos e do exsudato na cavidade peritoneal, 4 horas após sua administração. Durante as 4 horas, houve um aumento gradual na permeabilidade vascular, formação de exsudato e do número total de células que migram para o espaço peritoneal, principalmente um aumento no número de neutrófilos observado na Figura 26 (A, B e D), comparando a quantidade de células no grupo que foi injetado com salina no peritônio (grupo S) com o grupo de animais controle, que recebeu carragenina intraperitoneal (grupo C). No entanto, o número de células mononucleares no peritônio não foi modificado pela injeção de carragenina (Figura 26C).

O tratamento com acupuntura manual no SP6 foi realizado antes da injeção de carragenina e promoveu uma significativa inibição do processo inflamatório. Os resultados mostram uma diminuição total na contagem de células totais ($P < 0,001$) (Figura 26A), representada, principalmente, pelo influxo de neutrófilos com inibição de $96 \pm 2 \%$ ($P < 0,001$) (Figura 26B).

É importante ressaltar que o tratamento dos camundongos com o fármaco anti-inflamatório dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), antes da injeção de carragenina, foi capaz de reduzir a quantidade total de células na cavidade peritoneal dos camundongos (Figura 26A) e diminuiu completamente (100%) a migração de células no peritônio (neutrófilos) ($P < 0,001$) (Figura 26B).

A inflamação peritoneal induzida por carragenina, nos animais do grupo controle, foi acompanhada por um aumento da permeabilidade vascular abdominal, observada por exsudação do corante azul de Evans (Figura 26D). Os resultados deste trabalho indicaram que, tanto a acupuntura manual realizada no SP6, como o tratamento com dexametasona sistêmica, reduziram significativamente o extravasamento de azul de Evans de $95 \pm 4 \%$ e $96 \pm 5 \%$, respectivamente (Figura 26D).

Além disso, a contagem de neutrófilos na cavidade peritoneal induzida por carragenina em camundongos também foi observada indiretamente por meio de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), onde o grupo controle apresentou aumento da atividade da MPO,

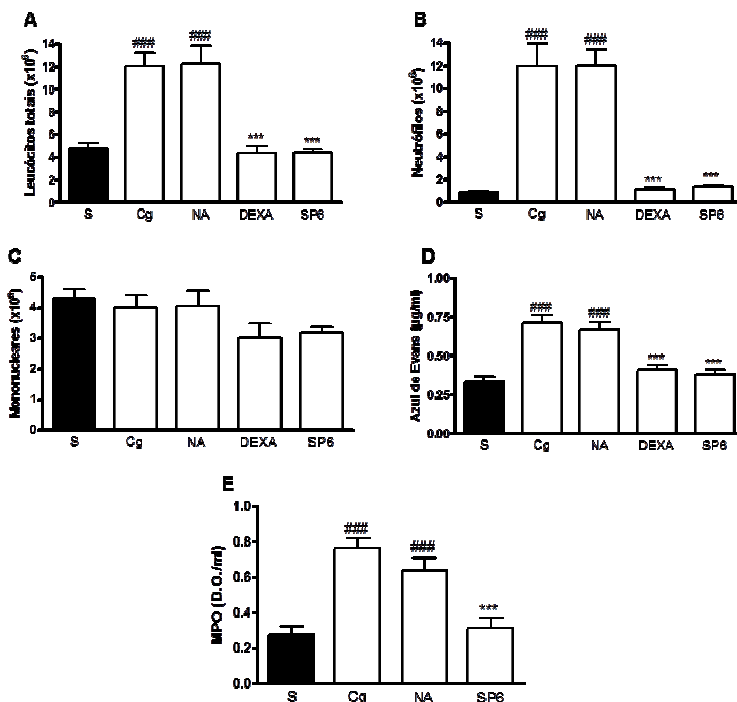
comparado aos animais do grupo que recebeu salina pela via intraperitoneal (Figura 26E). O tratamento de camundongos com acupuntura manual no acuponto SP6 também reduziu a atividade da MPO, com inibição de $98 \pm 1 \%$ (Figura 26E).

Destaca-se que não foi observada diferença estatística do grupo de animais tratados com NA (grupo NA) comparado ao grupo controle, em nenhuma das avaliações (Figura 26A, B, C, D e E). Portanto pode-se creditar à acupuntura manual realizada no acuponto SP6 o efeito anti-inflamatório encontrado nas avaliações descritas neste trabalho, e não a inserção da agulha em um local do corpo do camundongo onde não existe acuponto.

4.6.2.2 Acupuntura no SP6 não modifica níveis de TNF- α e IL-1 β porém, restabelece os níveis de IL-10 na peritonite induzida por carragenina

Os níveis de citocinas inflamatórias no líquido peritoneal dos animais do grupo controle (grupo C) estavam aumentados depois que os animais receberam carragenina, quando comparados aos níveis das mesmas citocinas no líquido peritoneal de animais que receberam salina (grupo S) (Figura 27). Além disso, pode-se observar que os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 diminuiu no líquido peritoneal dos animais do grupo controle, comparados aos níveis de IL-10 do grupo salina (Figura 27). Os valores das citocinas dos animais do grupo salina foram 62, 192 e 135 pg/ml, para TNF- α , IL-1 β e IL-10, respectivamente. No entanto, quando os animais receberam carragenina intraperitoneal, sem tratamento prévio, os níveis de citocinas TNF- α e IL-1 β aumentaram. Os valores dessas citocinas foram para 137 e 3480 pg/ml, respectivamente, no grupo controle. Porém os níveis de citocinas IL-10 nos animais do grupo controle diminuíram, chegando ao valor de 69 pg/ml.

Figura 26: Efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 ou da dexametasona i.p. (DEXA) na peritonite induzida por carragenina em camundongos.



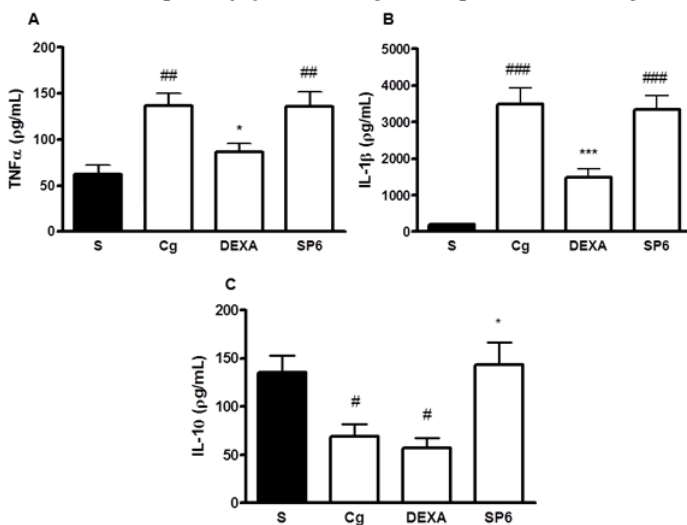
(A) Leucócitos totais, (B) número de neutrófilos (C) número de mononucleares, (D) concentração de azul de Evans (exsudato), (E) atividade da MPO. Os grupos experimentais foram formados por animais que receberam salina estéril (NaCl, 0,9%, i.p., S) ou que receberam carragenina (750 μg /camundongo, C - controle). O grupo DEXA representa os animais que receberam dexametasona i.p. (0,5 mg/kg - DEXA) 0,5 horas antes da injeção de carragenina. NA representa o grupo de animais que recebeu tratamento com o não-acuponto (10 min, NA) mais carragenina. SP6 representa o grupo de camundongos que foi tratado com acupuntura manual no SP6 (10 min, SP6) mais carragenina. Cada ponto representa a média de 6-8 animais e a barra de erro indica o E.P.M. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparados com os grupos controle (Cg), *** $P < 0.001$. ### $P < 0.01$ representa a comparação com o grupo salina (S). A estatística realizada foi ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls.

É importante notar que o tratamento dos animais com dexametasona causou inibição significativa dos níveis de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-

1 β , com redução dos níveis dessas citocinas no exsudato peritoneal dos animais do grupo dexametasona, comparados aos animais do grupo controle (valores de 86 e 1489 pg/ml, respectivamente) (Figura 27A e B). Contudo, os níveis de citocinas IL-10 não foram alterados no grupo dexametasona (Figura 24C).

Em contraste, ressalta-se que a acupuntura manual realizada no SP6 não foi capaz de reduzir os níveis de citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β no líquido peritoneal (Figura 27A e B), quando se compara os valores das citocinas entre os grupos SP6 e controle. Porém, a acupuntura realizada no acuponto SP6 restabeleceu os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (valores de 143 pg/ml) no líquido peritoneal dos animais, após a injeção de carragenina (Figura 27C).

Figura 27: Efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 ou da dexametasona i.p. sobre os níveis de TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-10 (C) no exsudato inflamatório induzido pela injeção de carragenina i.p. em camundongos.



Os animais receberam salina estéril (NaCl, 0.9%, i.p., S) ou carragenina (750 μ g/camundongo, C - controle), dexametasona (0.5mg/kg, i.p. - DEXA) mais carragenina ou receberam acupuntura manual no ponto SP6 (10 min, SP6) mais carragenina. Cada ponto representa a média de 6-8 animais e a barra vertical indica o E.P.M. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparados com os grupos controle (Cg), *P<0,05, ***P<0,001. ##P<0,05, ###P<0,01, ####P<0,001 representa a comparação com o grupo salina (S). A estatística realizada foi ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls.

4.6.2.3 Participação dos glicocorticóides endógenos no efeito da acupuntura manual, realizada no acuponto SP6, na peritonite induzida por carragenina

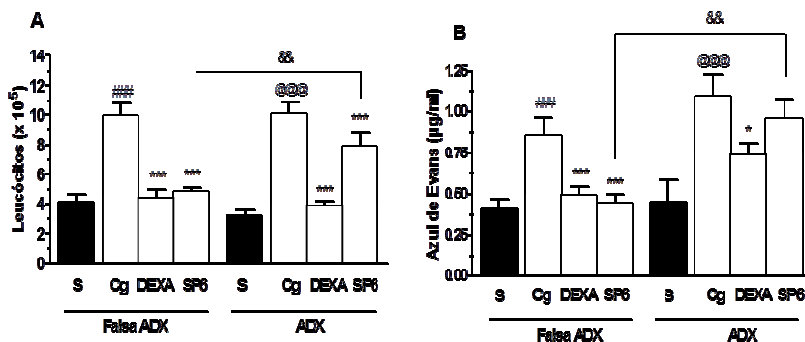
De forma similar aos resultados anteriores, nota-se que os animais que receberam carragenina intraperitoneal apresentaram aumento do número de leucócitos na cavidade peritoneal, bem como aumento do extravasamento plasmático. Como mostrado na Figura 28A, houve uma diferença significativa da contagem de leucócitos no líquido peritoneal dos animais que receberam carragenina e não tiveram a adrenal removida (grupo C – Falsa ADX), bem como do grupo operado (grupo C - ADX) comparado aos animais injetados com salina intraperitoneal, operados ou não (grupo S – Falsa ADX e grupo S - ADX).

Além disso, a contagem de leucócitos na cavidade intraperitoneal dos camundongos controle ADX (grupo C - ADX) não foi diferente estatisticamente do número de leucócitos no peritônio dos animais do grupo controle falso-operado (grupo C – Falsa ADX).

O tratamento com dexametasona reduziu a contagem leucocitária nos animais falso-ADX e nos animais ADX em $85 \pm 7 \%$ e $93 \pm 3 \%$, respectivamente. Ademais, a dexametasona reduziu o extravasamento plasmático em ambos os grupos tratados, tanto os operados quanto os falso-operados (Figura 28B).

Ao contrário, o tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 reduziu o número de leucócitos totais apenas nos animais falso-ADX em $75 \pm 9 \%$. Nenhuma inibição foi observada no número de células dos animais tratados com SP6 que tiveram a adrenal removida (SP6 – ADX) (Figura 28A). A acupuntura manual também foi capaz de reduzir o montante de azul de Evans, ou seja, o extravasamento plasmático, apenas em animais que foram falso-operados e não nos animais adrenalectomizados (Figura 28B).

Figura 28: Efeito da acupuntura manual no ponto SP6 ou da dexametasona i.p. na peritonite induzida por carragenina em camundongos que sofreram ou não adrenalectomia.



(A) mostra o número de células (leucócitos) que migraram para a região peritoneal após insulto com carragenina em camundongos. (B) observa-se o exsudato inflamatório induzido pela injeção de carragenina i.p. em camundongos. ADX, representa o grupo de animais que tiveram suas adrenais removidas e Falso ADX, representa os animais que passaram por procedimento cirúrgico, mas não tiveram remoção de suas adrenais. Os animais receberam salina estéril (NaCl, 0.9%, i.p., S) ou carragenina (750 µg/camundongo, C - controle) ou dexametasona (0.5 mg/kg, i.p. - DEXA) mais carragenina ou receberam acupuntura manual no ponto SP6 (10 min, SP6) mais carragenina. Cada ponto representa a média de 6-8 animais e a barra vertical indica o E.P.M. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparados com os grupos controle (Cg), * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$. ### $P < 0,001$ representa a comparação com o grupo salina adrenalectomizados (S – ADX); @@@ representa a comparação com o grupo SP6 ADX. A estatística realizada foi ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls.

4.7 PARTE IV: EFEITO DA ACUPUNTURA EM UM MODELO DE DOR MUSCULAR INDUZIDO POR CARRAGENINA

4.7.1 Metodologia

4.7.1.1 Modelo de inflamação muscular induzido pela carragenina

Nesta etapa, o efeito da estimulação do acuponto SP6 foi analisado em modelo de dor muscular inflamatória, induzida pela injeção de carragenina no músculo gastrocnêmio de camundongos. Para isto, os animais foram brevemente anestesiados com isoflurano (4%), e depois colocados em decúbito dorsal. O membro posterior direito, abaixo do joelho foi dividido em três partes: uma proximal ao joelho, uma medial e outra distal ao joelho. A agulha foi posicionada em um ângulo de 45°, em uma direção de distal para proximal (tornozelo para joelho) e inserida entre a porção distal e a medial do membro, distalmente ao joelho, no intuito de deixar o líquido (carragenina ou salina) depositado no ventre muscular do gastrocnêmio (parte mais medial do músculo). Injetou-se 20 µl de carragenina a 3%, dissolvida em solução salina estéril que tem um pH levemente ácido (6.0), típico de preparações comercialmente disponíveis de salina, ficando este o pH da solução final, no músculo gastrocnêmio (direito). Separadamente, outro grupo recebeu apenas salina intramuscular (i.m.) para posteriores comparações. As avaliações comportamentais foram realizadas antes e após a injeção de carragenina e/ou salina (WALTER et al, 2010).

Para melhor entendimento dos procedimentos que foram realizados, abaixo está descrito o protocolo experimental:

(a) Experimento 1: Efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 em modelo inflamatório de dor muscular. Para esta abordagem utilizamos os seguintes grupos: 1) salina (n=8), 2) controle (carragenina 3%) (n=8), 3) SP6 (carragenina mais tratamento com SP6) (n=8). Após 24 horas, foram realizados testes comportamentais: (a) de hipersensibilidade mecânica com filamentos de von Frey, (b) teste de hipersensibilidade térmica com Hargreaves, (c) hipersensibilidade mecânica com análise da pinça. Com esses mesmos animais, foi quantificado os níveis de citocina anti-inflamatória IL-10 no músculo gastrocnêmio.

(b) Experimento 2: Efeito da estimulação do acuponto SP6 no modelo inflamatório de dor muscular, induzida por carragenina, em camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes. Para estudar os efeitos da

estimulação da acupuntura no SP6 em animais C57BL/6 e IL10/- machos, foi injetada solução salina ou carragenina (3%) intramuscular. Para tanto, foram utilizados os seguintes grupos: Grupo 1: Salina (animais C57BL/6 que receberam salina) (n=8); Grupo 2: Controle (animais C57BL/6 que receberam carragenina) (n=8); Grupo 3: IL10/- (animais IL10/- tratados com carragenina) (n=8); Grupo 4: SP6 (C57BL/6 tratados com acupuntura no SP6 mais carragenina) (n=8); Grupo 5: IL10/- SP6 (animais IL10/- tratados com acupuntura no SP6 mais carragenina) (n=8). Após 24 horas, foram realizados os seguintes testes comportamentais: (a) de hipersensibilidade mecânica com filamentos de von Frey, (b) a sensibilidade mecânica, com uma pinça, (c) edema muscular com uso de pletismômetro, (d) paradigma fuga/esquiva. No final das avaliações comportamentais, os músculos gastrocnêmio foram retirados e utilizados para a avaliação de macrófagos por imunoistoquímica.

4.7.1.2 Avaliação da hipersensibilidade mecânica após indução da dor muscular e tratamento com acupuntura manual no SP6

Em todos os testes comportamentais, os animais foram aclimatados dois dias antes das avaliações, para evitar o estresse causado pelo ambiente diferente ao qual estavam sendo expostos. A hipersensibilidade mecânica foi avaliada com filamentos de von Frey (Stoelting, Chicago, EUA), como descrito anteriormente no item 4.4.1.8. O limiar mecânico nociceptivo foi avaliado antes da injeção de carragenina, para caracterizar a resposta inicial, bem como 24 horas depois e no 1º, 2º, 4º, 7º, 9º, 11º e 13º dias após o primeiro tratamento com SP6 (decorso de tempo).

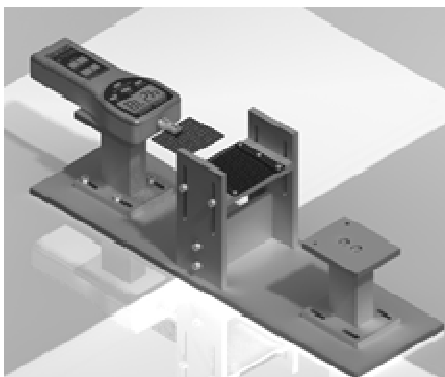
4.7.1.3 Avaliação da hipersensibilidade mecânica pelo teste de força de preensão da pata após dor muscular e tratamento com acupuntura

A avaliação da força de preensão plantar foi utilizada como análise comportamental de hipersensibilidade mecânica, no intuito de confirmar os efeitos antinociceptivos do acuponto SP6 (KEHL; TREMPER; HARGREAVES, 2000). A mensuração da força máxima compressiva exercida pela pata posterior foi realizada sobre uma grade de arame que estava acoplada a um sistema de avaliação de força (Force Gauge, Instrutherm, Brasil) (Figura 29). Durante o teste, cada animal foi suavemente contido para que assim pudesse agarrar, somente com um

dos membros posteriores, a malha de arame (10 × 12 cm) ligada a um medidor de tensão que mensurou (em gramas) a força exercida pelo animal. O animal foi movido em direção rostro-caudal, pelo experimentador, até exercer a força compressiva máxima.

Cada animal foi testado duas vezes, com intervalos de 2-3 min obtendo-se a média unilateral da força. Foram avaliados separadamente os membros inferiores direito e esquerdo, e a força de preensão foi expressa como a diferença (em gramas) entre a força de preensão da pata ipsilateral à lesão muscular (direita) e a pata contralateral (esquerda), para correção de diferenças individuais. A hipersensibilidade mecânica foi avaliada antes da indução da inflamação para caracterizar a resposta basal, bem como 24 horas após a injeção de carragenina e nos dias 1, 3, 8, e 10 após o primeiro tratamento com acupuntura.

Figura 29: Representação do sistema de avaliação de força (Force Gauge, Instrutherm, Brasil), utilizado no teste de preensão plantar para avaliação da hipersensibilidade mecânica.



4.7.1.4 Avaliação da hipersensibilidade térmica ao calor após dor muscular e tratamento com o acuponto SP6

Avaliação da hipersensibilidade térmica foi realizada por meio do teste de Hargreaves et al (1988), sendo realizado como decrito no item 4.4.1.9. Três medidas são realizadas em intervalos de tempo de 5 a 10 minutos e a latência de retirada foi expressa como a média dessas três medidas. A hipersensibilidade térmica ao calor foi avaliada antes da injeção de carragenina no músculo para caracterizar a resposta basal,

bem como 24 horas depois e no 1º, 3º, 8º e 10º dias após o primeiro tratamento com acupuntura.

4.7.1.5. Determinação do conteúdo de IL-10 em músculo após a injeção de carragenina

Depois de 48 horas da injeção de carragenina, o músculo gastrocnêmio. Foi realizado corte na pele na região do tendão calcâneo e a mesma foi removida do membro, separando-a do músculo e fâscias. O tendão foi seccionado e manteve-se ele seguro por uma pinça, afastando vagarosamente a pinça da parte óssea (puxando para cima) e divulsionando o músculo gastrocnêmio do sóleo. Os músculos gastrocnêmios foram removidos, o tendão foi seccionado e o tecido adiposo retirado, sobrando cerca de cerca de 200 mg de músculo, o músculo sóleo não foi usado para análise. Nos animais tratados, foi removido o músculo 1 hora após o tratamento com acupuntura no SP6. Todas as amostras de tecido foram pesadas, congeladas e armazenadas a -70°C.

Para avaliação da IL-10, as amostras foram homogeneizadas em fosfato - solução salina tamponada (PBS, pH 7,4) contendo Tween 20 (0,05%), 0,1 mM flúor fenilmetanossulfonil (PMSF), 10 mM de EDTA, 2 ng/mL de aprotinina, e 0,1 mM de cloreto de benzetônio. Os tecidos foram homogeneizados e centrifugados a 3000x g durante 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante obtido foi armazenado a -70°C até análise posterior. O total de proteína do sobrenadante foi medida utilizando o método de Bradford. O conteúdo de IL-10 foi avaliado usando alíquotas das amostras obtidas (100 µL) e kits de ELISA para IL-10 de camundongos da R&D Systems com faixa de detecção de 31,25-2000pg/mL (Minneapolis, MN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância para todas as citocinas estudadas foi medida utilizando leitor de microplacas a 450 e 550 nm, e corrigida pelo valor da quantidade de proteína existente em cada respectiva amostra. O conteúdo final de IL-10 foi expresso em pg/mg de proteína.

4.7.1.6 Avaliação da sensibilidade mecânica no músculo após injeção de carragenina no gastrocnêmio e tratamento com o acuponto SP6

A sensibilidade muscular foi testada apertando-se o músculo gastrocnêmio dos camundongos com um par de pinças calibradas, até que o camundongo apresentasse o comportamento de retirada do membro. A força de preensão no momento em que o animal retirou o

membro foi medida em mN. Uma diminuição no limiar de retirada foi interpretada como hipersensibilidade muscular primária. Foi medida a sensibilidade em ambos os músculos gastrocnêmios direito (ipsilateral) e esquerdo (contralateral). A sensibilidade muscular foi testada como se segue: antes da injeção de carragenina no músculo, 24 horas depois, três e cinco dias após a injeção de carragenina (WALTER et al, 2010).

4.7.1.7 Avaliação do edema muscular após injeção de carragenina no músculo e tratamento com o acuponto SP6

O edema muscular foi avaliado utilizando-se um pletismômetro (Ugobasile). Foram realizadas três medidas em ambos os membros posteriores, e os dados foram expressos (em mililitros). Foi calculada a média das medidas obtidas e o resultado final foi a diferença entre o valor da média do músculo injetado com carragenina (lado direito) e a média do músculo contralateral (lado esquerdo). O edema foi avaliado antes da indução da inflamação, para caracterizar a resposta basal, e também foi avaliado depois da injeção de carragenina e nos cinco dias seguintes.

4.7.1.8 Avaliação do paradigma fuga/esquiva após injeção de carragenina no músculo e tratamento com o acuponto SP6

Uma caixa de Plexiglas (16 cm x 7 cm x 13 cm), foi colocada na parte superior de uma tela de malha de arame, similar a usada na avaliação do von Frey (item 4.4.1.8.). Metade da caixa foi encapada, na parte exterior, com papel branco e preto, com linhas verticais, enquanto a outra metade foi encapada da mesma forma, mas com papel somente branco, a fim de que não houvesse nenhuma preferência pelos animais. Durante os testes comportamentais foi permitido aos camundongos mover-se sem restrições a ambos os lados da caixa, por um período de 30 minutos. A estimulação mecânica das patas foi realizada com um filamento de von Frey, de 0,4 g, à superfície plantar da pata posterior direita ou esquerda. O lado direito foi estimulado quando o animal estava na metade da caixa branca com linhas verticais pretas, e a pata esquerda foi estimulada quando o animal estava do lado oposto da caixa (lado branco). Os estímulos com o filamento eram realizados sem cessar, na pata posterior (direita ou esquerda) uma vez por segundo. As medições foram avaliadas antes da injeção de carragenina, 24h e 5 dias depois. O tempo que os animais passaram em cada lado da caixa foi

calculado e utilizado no gráfico como uma porcentagem do tempo em 30 minutos (porcentagem de tempo gasto no lado branco com preto).

4.7.1.9 Perfusão Transcardial, preparação da fatia de tecido e imunoistoquímica para macrófagos após injeção de carragenina no músculo e tratamento com o acuponto SP6.

Nesta etapa foi realizada imunoistoquímica para marcação dos macrófagos e posterior identificação e comparação do número total de macrófagos, bem como dos respectivos subtipos funcionais M1 e M2. Para esta avaliação, foram utilizados os seguintes grupos: (1) salina i.m., (2) C57BL/6, (3) IL10-/-, (4) C57BL/6 SP6, (5) IL10-/- SP6, melhor descritos no item 4.7.1.1. (Experimento 2). Os animais foram anestesiados para posterior perfusão intracardiaca com 0,1M de tampão fosfato (PBS), seguido de paraformaldeído (PFA) recém-preparado à 4% em 0,1M PBS. Foi realizado corte na pele na região do tendão calcâneo e a mesma foi removida do membro, separando-a do músculo e fâscias. O tendão foi seccionado e manteve-se ele seguro por uma pinça, afastando vagarosamente a pinça da parte óssea (puxando para cima) e divulsionando o músculo gastrocnêmio do sóleo. Os músculos gastrocnêmios foram removidos, o tendão foi seccionado e o tecido adiposo retirado, posteriormente os músculos foram pós-fixados em 4% de PFA durante a noite (4°C). No dia seguinte, a solução foi alterada para 15% de sacarose em PBS (4°C), no terceiro dia foi modificada para sacarose 30% em PBS (4°C), no quarto dia para sacarose 30% em PBS mais solução de congelamento (1:1) (4°C). No quinto dia, utilizando solução de congelamento, as amostras foram colocadas em pequenos moldes, depositadas verticalmente, usando um método chamado Gentle Jane (técnica utilizada no laboratório).

Os músculos foram cortados em secções de 20µm em um criostato, eles eram posicionados de modo que os cortes iniciavam na porção distal do músculo (próximo ao tornozelo). Foram realizadas sequências de quatro cortes (um em cada lâmina) e descartados oito cortes, até que as lâminas apresentassem dez cortes cada uma. O restante da amostra foi armazenado para eventuais necessidades de repetições de análises. Todos os cortes foram lavados duas vezes em PBS durante 5 minutos cada, seguido por breve enxague em PBST (PBS, 0,1% triton X-100; NaAzide 1:100). Depois, bloqueou-se com bloqueador FcReceptor durante 20 min, e seguidamente foi adicionado uma quantidade igual de soro de cabra (10%) em PBS por 20 minutos. Para marcar macrófagos M1, as secções foram incubadas durante a noite com

hamster anti CD11c (Abdserotec- 1:100). No segundo dia, os cortes foram incubados com fragmento não conjugado de cabra anti-rato (JIR) 1:100 durante 30 minutos, seguido por paraformaldeído a 1% em PBS durante 10 minutos; posteriormente eles foram novamente incubados em anticorpo primário (anti-rato Abdserotec F4/80 , 1:250 + Jackson Immuno Research cabra-hamster Rhod-Red-X, 1:500), durante 3 horas e pré-incubados com anticorpos secundários (Jackson Immuno Research-fab fragment goat anti rat Dylight 488, 1:500, Jackson Immuno Research-goat hamster Rhod-Red-X, 1:100 + 4% mouse serum) por 1 hora. Em outras amostras, os cortes foram incubados durante a noite com marcador para macrófagos M2 Biotin rat α CD206 (Abdserotec - 1:200). No segundo dia da imunocoloração, o mesmo protocolo foi utilizado para essas amostras, incubadas com anticorpo primário (Abdserotec- rat anti-F4/80, 1:250 + Invitrogen-Strep-568 1:5000) durante 3 horas e pré-incubadas com anticorpos secundários (Jackson Immuno Research-fab fragment goat anti-rat Dylight 488, 1:500, Invitrogen-Strep-568 1:500 + 4% mouse serum) durante 1 hora. As lâminas foram encobertas com lamínulas com auxílio de Vectashield. Todos os anticorpos foram diluídos igualmente (100%+ 1% NGS+ 0.1% Triton-X 100+ 1:100 azida sódica).

Para capturar as imagens, foi utilizado o BioRad LaserSharp2000, da Universidade de Iowa (USA), de acordo com procedimentos exigidos pela instituição, após realização de treinamento técnico para operação do mesmo. Foi escolhido o local a ser capturado visualmente, utilizando uma câmera objetiva de 20X. O filtro de epifluorescência foi FITC/Cy3/F4, ajustando o nível dos parâmetros (Iris, Gain and Offset) em cada canal para otimização da imagem. Usando o foco do motor, foram retiradas pelo menos três fotografias em cada imagem de captura (camadas), cinco capturas por animal. Após a aquisição das imagens, usando o programa ImageJ, foi verificada cada foto individualmente para contar a quantidade de macrófagos totais, sendo considerado como macrófago a imagem onde a morfologia e a cor (F4/80 - em verde) indicasse isso. Além disso, foram comparados os macrófagos verdes (primeira imagem - F4/80) com os macrófagos amarelos (segunda foto - F4/80 mais CD11c ou F4/80 mais α CD206). Quando a primeira imagem (verde) estava no mesmo lugar que a segunda imagem (amarela), foi confirmado como sendo um macrófago M1 ou M2 e contabilizado como diferencial de macrófagos. Os resultados foram representados graficamente como macrófagos totais e percentuais de cada respectivo subtipo funcional M1 e M2.

4.7.2 Resultados

4.7.2.1 Hipersensibilidade mecânica e térmica induzida pela carragenina e efeito da acupuntura no acuponto SP6

Os resultados apresentados na Figura 30 demonstram que o limiar de retirada da pata no grupo controle (grupo C) diminuiu após a injeção de carragenina, em comparação com o grupo que recebeu injeção intramuscular de salina. Estes resultados foram observados desde os primeiros 30 minutos de avaliação após a injeção de carragenina até os 11 dias posteriores (Figura 30A e B).

O tratamento agudo com acupuntura manual no SP6 reduziu significativamente a hipersensibilidade mecânica em animais que receberam carragenina em 0,5 e 1 hora ($P < 0,05$ em ambos) (Figura 30A). A redução da hipersensibilidade alcançada com o tratamento com acupuntura permaneceu até 1 hora após o primeiro tratamento (Figura 30A), tempo escolhido para os testes comportamentais realizados posteriormente.

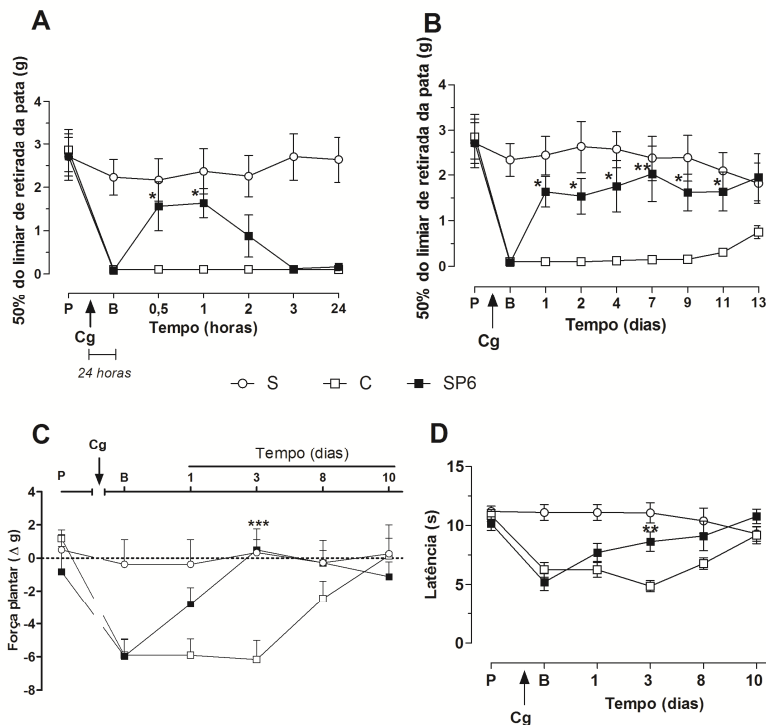
Foi observado que o tratamento diário com acupuntura manual no SP6 foi eficaz em diminuir a hipersensibilidade mecânica, por um período de 11 dias (11 tratamentos), ($P < 0,05$ em 1°, 2°, 4° e 11° dias após o tratamento e $P < 0,01$ no 7° dia após o tratamento) (Figura 30B). No 13° dia de avaliação, os animais do grupo controle voltaram a responder de maneira similar aos animais que receberam salina intramuscular (Figura 30B); portanto, neste momento, as avaliações foram interrompidas.

Confirmando a hipersensibilidade mecânica induzida pela carragenina, observa-se que os animais do grupo controle apresentam redução da preensão da pata, comparando aos animais do grupo salina. No 8° dia após a injeção de carragenina, os animais do grupo controle voltaram a responder como antes da injeção de carragenina (Figura 30C). No entanto, verificou-se que o tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 reduziu significativamente a hipersensibilidade mecânica, avaliada no teste de preensão da pata, no 3° dia de tratamento ($P < 0,01$) (Figura 30C).

Além disso, a carragenina causou hipersensibilidade térmica na pata dos animais do grupo controle, em comparação com os animais do grupo que recebeu salina intramuscular (Figura 30D). No 8° dia após a injeção de carragenina, os animais do grupo controle voltaram a responder como antes da injeção de carragenina. O tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 reduziu significativamente a

hipersensibilidade térmica apenas no 3º dia de tratamento ($P<0,01$) (Figura 30D).

Figura 30: Efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 na hipersensibilidade mecânica térmica induzida por carragenina i.m. em camundongos.



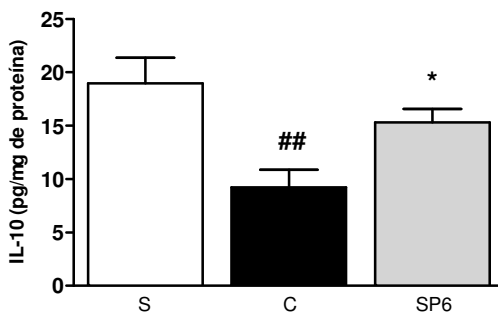
(Cg) representa a injeção de Carragenina, (P) representa a avaliação pré-carragenina e (B) representa a avaliação Basal após a injeção de carragenina e antes do tratamento com acupuntura. A avaliação posterior a (B) equivale à primeira avaliação após o tratamento com SP6. (A) representa a avaliação da hipersensibilidade mecânica por filamentos de von Frey por até 24 horas depois do tratamento com acupuntura no ponto SP6. (B) representa a avaliação da hipersensibilidade mecânica por filamentos de von Frey por até 13 dias depois do primeiro tratamento com acupuntura no ponto SP6. (C) representa a avaliação da hipersensibilidade mecânica através do teste de força de preensão da pata por até 10 dias depois do primeiro tratamento com acupuntura no ponto SP6. (D) representa a avaliação da hipersensibilidade térmica ao calor por até 10 dias depois do primeiro tratamento com acupuntura no acuponto SP6. Os animais receberam salina estéril i.m. (grupo S) ou carragenina i.m. (3%, grupo

C) ou carragenina i.m. mais tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 (grupo SP6). Cada ponto representa a média de 6-8 animais e a barra de erro indica o E.P.M. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparados com os grupos controle (C), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Por motivos estéticos foram omitidos nos gráficos os símbolos de comparação com o grupo S. A estatística realizada foi ANOVA de duas vias, seguida de teste post hoc de Bonferroni.

4.7.2.2 Efeito da acupuntura manual no SP6 nos níveis de citocina IL-10 no músculo gastrocnêmio após a injeção de carragenina em camundongos

Nossos dados revelam que o grupo que recebeu o agente flogístico no músculo (grupo C) apresentou redução nos níveis de IL-10 em comparação aos níveis dessa citocina no músculo de animais do grupo salina ($P < 0,01$). Em contraste, o tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 foi capaz de restabelecer os níveis de citocina IL-10 ($P < 0,05$) (Figura 31).

Figura 31: Efeito da acupuntura manual no acuponto SP6 sobre os níveis de citocinas IL-10 no músculo gastrocnêmio em animais com dor muscular induzida por carragenina.



Os animais receberam salina estéril i.m. (S), carragenina i.m. (3%, C) e carragenina i.m. mais tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 (SP6). Cada ponto representa a média de 6-8 animais e a barra de erro indica o E.P.M. ## $P < 0,01$ representa a diferença estatística entre o grupo C e o grupo S. * $P < 0,05$, denota os níveis de significância, quando comparados com os grupos C. A estatística realizada foi ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls.

4.7.2.3 Efeito da acupuntura manual no SP6 sobre a hipersensibilidade mecânica e edema induzidos pela carragenina em animais C57BL/6 e animais IL-10-/-.

De forma complementar aos dados anteriores, demonstra-se nos resultados a seguir que a carragenina injetada no músculo gastrocnêmio reduziu o limiar nociceptivo dos animais dos grupos controle (grupo C) e IL-10-/-, quando comparados com animais do grupo salina (Figura 32A). Portanto, através de nossos resultados podemos observar que a carragenina causou hipersensibilidade mecânica em ambos os grupos, avaliados por filamentos de von Frey na pata ipsilateral à injeção, durante os primeiros cinco dias após a injeção desse agente flogístico (Figura 32A).

Os animais C57BL/6 tratados com acupuntura manual no SP6 (grupo SP6) tiveram aumento do limiar nociceptivo quando avaliados 30 minutos após o tratamento com acupuntura. Este efeito foi repetido nos próximos dias de avaliação, até o quinto dia após a injeção de carragenina ($P < 0,001$) (Figura 32A).

Animais nocautes para IL-10 (IL10-/-) apresentaram hipersensibilidade mecânica similar ao grupo controle (Figura 32A). No entanto, observou-se que os animais do grupo IL-10-/- que receberam tratamento com acupuntura (IL10-/- SP6) não responderam à estimulação da agulha com efeito antinociceptivo, como os animais do tipo selvagem responderam. Não houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo IL10-/-, comparados ao grupo IL-10-/- SP6 (Figura 32A).

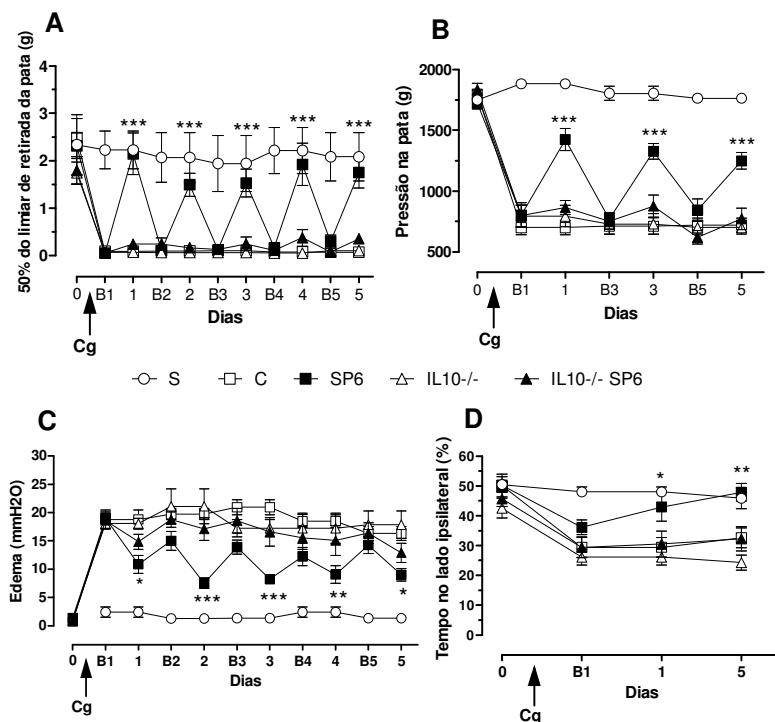
No teste com as pinças, observou-se redução do limiar nociceptivo mecânico em 24 horas, três e cinco dias após a injeção de carragenina no grupo controle e grupo IL-10-/-, em comparação com os animais do grupo salina intramuscular (Figura 32B). Não houve diferença estatística entre os grupos controle e IL-10-/- (Figura 32B). Assim como na avaliação com os filamentos de von Frey, os animais que receberam tratamento com acupuntura manual no SP6 tiveram aumento do limiar nociceptivo na avaliação com a pinça, e este efeito foi repetido nos próximos dias de avaliação ($P < 0,001$) (Figura 32B). Contudo, os animais nocautes que receberam acupuntura no SP6 (IL-10-/- SP6) responderam ao estímulo da pinça de forma similar aos grupos controle e IL-10-/- (Figura 32B).

Quando foi avaliado o edema muscular, observou-se que tanto o grupo de animais controle como os animais do grupo IL-10-/- apresentaram aumento do volume do músculo, avaliado por

pletismômetro, em relação aos animais do grupo salina intramuscular (Figura 32C). Realizou-se esta avaliação nos cinco dias posteriores a injeção de carragenina e observou-se um aumento no volume do músculo em todas as avaliações em ambos os grupos (controle e IL-10/-). A acupuntura foi eficaz em reduzir o edema ($P<0,05$ no 1° e 5° dias, $P<0,001$ no 2° e 3° dias e $P<0,01$ no 4° dia) nos animais tipo selvagens, mas não no grupo IL-10/- SP6 (IL-10/- tratados com acupuntura manual no SP6) (Figura 32C).

Esses resultados, em conjunto, são importantes para demonstrar a importância da citocina anti-inflamatória IL-10 no efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da acupuntura realizada no acuponto SP6, pois essa citocina parece ser essencial para que a acupuntura manual reduza a nocicepção e inflamação no músculo.

Figura 32: Efeito da acupuntura manual no SP6 sobre a hipersensibilidade mecânica e edema induzida pela carragenina em animais C57BL/6 e animais nocaute para a citocina IL-10 (IL-10^{-/-}).



(A) hipersensibilidade mecânica avaliada por filamentos de von Frey, (B) hipersensibilidade mecânica avaliada por preensão com pinça, (C) edema muscular avaliado com pletismômetro. (D) tempo de permanência do animal no lado ipsilateral à lesão na avaliação fuga/esquiva. Os animais receberam salina estéril i.m. (S.) ou carragenina i.m. (3%, grupo C e IL-10^{-/-}) ou carragenina i.m. mais tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 (SP6 e IL-10^{-/-} SP6). (0) representa a resposta dos animais antes da injeção de carragenina ou salina no músculo. (B) representa o basal diário dos animais, ou seja, é a avaliação antes do tratamento em cada dia de teste. Cada ponto representa a média de 6-8 animais e a barra de erro indica o E.P.M. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparados com o grupo C, *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001. Por motivos estéticos foram omitidos nos gráficos os símbolos de comparação com o grupo S. A estatística realizada foi ANOVA de duas vias, seguida de teste post hoc de Bonferroni.

4.7.2.4 Efeito da acupuntura manual realizada no acuponto SP6 sobre a quantidade e o fenótipo de macrófagos presentes no músculo após injeção de carragenina

A carragenina é um agente flogístico que induz migração de leucócitos para a região injetada; entre eles, os macrófagos se destacam por serem a principal fonte de IL-10. A fim de avaliar a possível contribuição dos macrófagos para o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 no modelo de dor muscular induzido por carragenina, foi realizada a imunomarcagem específica para macrófagos encontrados nos músculo gastrocnêmio. Os resultados mostram que a carragenina intramuscular (grupo C) aumentou significativamente o número de macrófagos presentes nos gastrocnêmios lesionados, em comparação com o grupo de animais que recebeu solução salina intramuscular (Figura 33A). Além disso, pode-se observar que, proporcionalmente, o aumento no número de macrófagos foi do tipo M1, que são macrófagos inflamatórios (Figura 33B).

A IL-10 desempenha um papel importante na regulação do recrutamento dos neutrófilos, e animais nocaute para IL-10 apresentam um maior recrutamento de neutrófilos em comparação com animais selvagens (CHMIEL et al, 2002). No entanto, neste estudo não foi observado diferença na avaliação comportamental ou na quantidade de macrófagos entre animais nocautes (IL-10^{-/-}) e selvagens (C57BL/6) (Figura 33A e B).

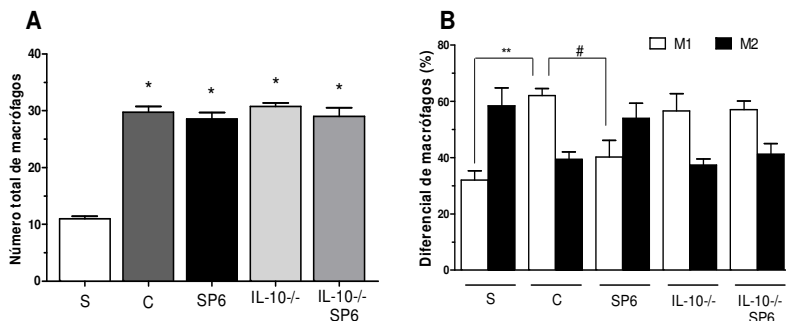
Além disso, a fim de verificar se a acupuntura poderia diminuir o número de macrófagos que migraram para a área lesionada, compararam-se os grupos de animais tratados com acupuntura no SP6 e animais controle, e não se pode verificar diferença estatística entre os grupos (Figura 33A). Ou seja, a acupuntura não reduziu o número total de macrófagos observados nos músculos de animais que receberam carragenina.

No entanto, através da análise de diferencial de macrófago (tipo M1 ou M2), observou-se que o número de macrófagos do tipo M1 no grupo SP6 não aumentou na mesma extensão do que os animais do grupo controle ($P < 0,02$) (Figura 33B). Ainda observou-se que a quantidade de macrófagos do tipo M2 no grupo SP6 estava aumentada, quando comparada ao grupo controle (grupo C) ($P < 0,02$) (Figura 33B). Ou seja, a acupuntura parece atuar como um dispositivo que abre e fecha um circuito, fazendo com que haja uma quantidade maior de

macrófagos anti-inflamatórios tipo M2 que migram ou se formam posteriormente ao tratamento contínuo com acupuntura.

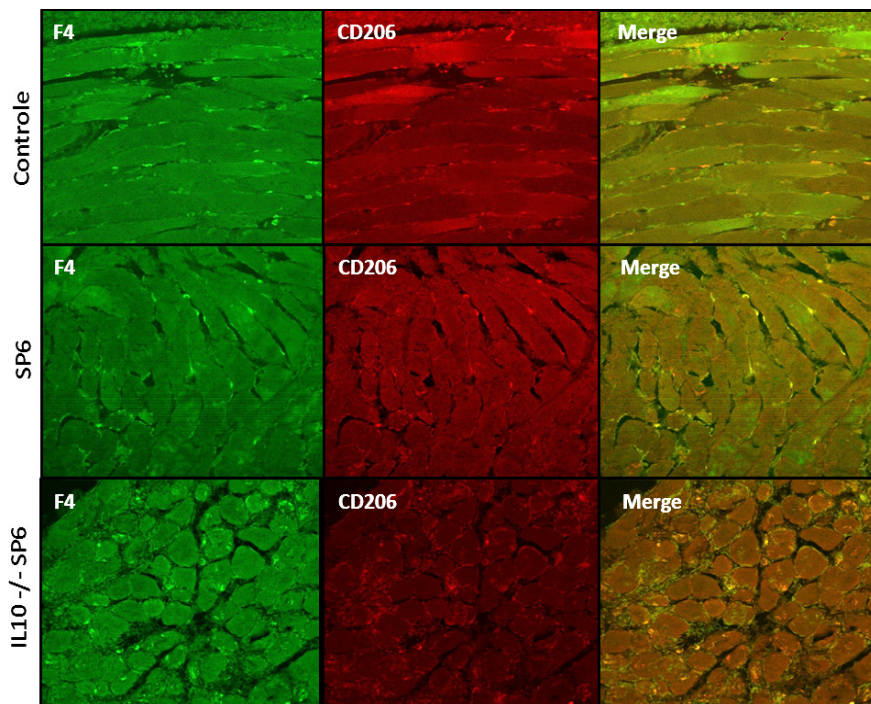
A imunistoquímica do músculo gastrocnêmio está demonstrada na Figura 34.

Figura 33: Efeito da acupuntura manual no SP6 sobre a quantidade total e diferencial de macrófagos.



Os animais receberam salina estéril i.m. (S) ou carragenina i.m. (3%, C - controle e IL-10^{-/-}) ou carragenina i.m. mais tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 (SP6 e IL-10^{-/-} SP6). (A) indica o total de macrófagos por grupo; (B) representa a quantidade em porcentagem de macrófagos dos tipos M1 e M2 por grupo. Cada ponto representa o montante de 6 animais e a barra de erro indica o E.P.M. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparados com o grupo C, *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001. Por motivos estéticos foram omitidos nos gráficos os símbolos de comparação com o grupo S. A estatística utilizada foi ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey com múltiplas comparações.

Figura 34. Imunoistoquímica do músculo gastrocnêmio em animais do grupo Controle, SP6 e IL-/- SP6.



As marcações observadas na figura são realizadas para mostrar macrófago, F4 (em verde), e para mostrar macrófago do tipo M2, CD206 (em vermelho). A primeira coluna esta marcada para F4, a segunda para CD206 e na terceira coluna as duas marcações estão colocadas. Os macrófagos estão demonstrados na terceira coluna marcados na cor amarela.

5 DISCUSSÃO

5.1 PARTE I: ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA ACUPUNTURA NO ACUPONTO SP6, ESPECIFICIDADE E MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS

A maior parte das terapias utilizadas na clínica passa por diversas fases de estudos pré-clínicos até serem praticadas em humanos. Contudo, a acupuntura seguiu o caminho inverso, sendo utilizada primeiro em humanos para depois ser estudada em animais. Os dados empíricos adquiridos com o uso da acupuntura em humanos forneceram idéias da utilização dos pontos de acupuntura para o tratamento de várias doenças. O uso clínico e também as pesquisas sobre acupuntura ganharam destaque na última década, pois além da redução da dor, esta terapia esta sendo utilizada no alívio de vários sintomas de diferentes tipos de doenças, muitos deles difíceis de serem tratados com drogas tipicamente usadas na prática clínica (NIH Consensus Conference, 1998; GOLDMAN et al, 2010). Apesar da crescente visibilidade da acupuntura, seus praticantes ainda enfrentam o ceticismo de parte da comunidade científica em relação à presença de efeitos fisiológicos específicos que justifiquem a utilização da acupuntura, bem como sua real efetividade. Portanto, embora a acupuntura esteja sendo extensivamente estudada por grandes pesquisadores, essa técnica ainda precisa de provas verdadeiras de sua eficácia, com pesquisas de rigor científico e, principalmente, sem conflitos de interesse (CHO et al, 2006; GOLDMAN et al, 2010; HAN, 2011). Neste contexto, o presente trabalho busca contribuir para o fornecimento de uma base científica sólida visando a elucidação do efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da estimulação manual através da inserção de agulha no acuponto SP6, bem como, dos mecanismos neurobiológicos endógenos envolvidos no controle da dor aguda e crônica de origem neuropática e inflamatória produzidos por essa terapia.

5.1.1 Acupuntura manual no acuponto SP6 possui atividade antinociceptiva nos modelos de nocicepção aguda induzida por ácido acético e formalina

Alguns autores consideram que os benefícios da acupuntura resultam de efeitos não específicos, tais como a convicção do terapeuta e

o entusiasmo ou credence do paciente (CHERKIN et al, 2009). Associado aos estudos de outros profissionais, revisões sistemáticas referentes à acupuntura concluíram que essa terapia possui nenhum ou poucos efeitos específicos sobre a dor (ERNST et al, 2011).

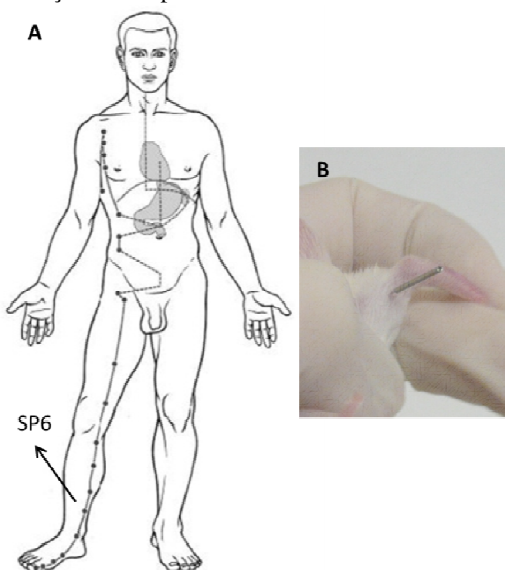
Essas conclusões geraram grandes críticas quanto à efetividade da acupuntura e quanto aos métodos utilizados pelos autores para chegarem a essas conclusões. Por outro lado, estudos de revisões científicas podem gerar limitações nas conclusões específicas ou conclusões baseadas em evidências, pois sua interpretação pode ser influenciada por preconceitos e pelo ponto de vista dos seus autores, bem como dos leitores. Entretanto, revisões sistemáticas podem ter um impacto importante sobre a política e a percepção pública, e devem ser realizadas com os mesmos padrões elevados como as realizadas nas revisões de ensaios randomizados (MANHEIMER; BERMAN, 2011).

Apesar de todas as discussões, a acupuntura tem sido usada há séculos em países asiáticos para tratar muitas doenças, e o tratamento para o alívio da dor (analgesia) pela acupuntura é aceito em todo o mundo. Em bases científicas, o artigo mais antigo encontrado que comenta sobre a acupuntura foi publicado em 1827, com relatos de um médico que usa agulhas de acupuntura para tratar reumatismo em seus pacientes e diz que os efeitos eram frequentemente “mágicos” (ELLIOTSON, 1827). No entanto, apenas no início da década de 1970 é que foram publicados os primeiros estudos científicos mais rigorosos sobre o efeito analgésico da acupuntura, em animais e humanos. Geralmente os pesquisadores usavam a eletroacupuntura para aliviar a dor com base nos estudos de Melzack e Wall, e ativação de fibras sensoriais de grosso calibre (ANDERSSON et al, 1973a; ANDERSSON et al, 1973b; LIN; CHEN, 2009).

Devido às discussões fervorosas quanto à acupuntura e sua efetividade, deu-se início as pesquisas no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação para averiguar se ela realmente teria efeito antinociceptivo. Para reduzir as variáveis, foi escolhido um ponto de acupuntura grandemente utilizado na clínica, para assim, discordar ou corroborar com os autores supracitados. O acuponto escolhido pertence ao meridiano do baço-pâncreas, que possui 21 acupontos, e tem a nomenclatura alfa-numérica definida pela Organização Mundial de Saúde como SP6 (Spleen 6). Na prática clínica, os pontos de acupuntura podem ser utilizados isoladamente ou em combinação, podendo tratar a dor no local onde estão situados e no trajeto do meridiano a que pertencem ou tratar a dor por sua função específica (MOLSBERGER et

al, 2008). O acuponto SP6 (Figura 35) é comumente usado no tratamento em humanos para combater uma ampla gama de sintomas, incluindo: distúrbios gástricos como dor de estômago e distensão abdominal, constipação, diarreia, vômito, disenteria, indigestão e outros (LI et al, 1992; SENNA-FERNANDES et al, 2011).

Figura 35: Representação do acuponto SP6 em humanos e camundongos.



Em (A) observa-se o meridiano do baço-pâncreas; a seta preta representa a localização anatômica do SP6, sexto ponto do meridiano do baço-pâncreas do pé até o peito. (B) representa a localização do SP6 em camundongos, com a agulha inserida. Não se pode afirmar a existência de meridianos em camundongos, mas consegue-se realizar a colocação dos pontos de acupuntura.

Fonte: Adaptado de Kavoussi e Ross, 2007.

Neste trabalho, a acupuntura manual no acuponto SP6, com manipulação da agulha, realizada antes da injeção de agentes algésicos, preveniu a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético e pela formalina. Alguns autores sugerem que quando uma agulha de acupuntura é inserida em um designado ponto no corpo, esta é capaz de produzir uma estimulação inicialmente física (ex. mecânica), ocorrendo posteriormente a ativação elétrica que depende do componente fisiológico. Neste sentido, vários componentes neurais e neuroativos são ativados na pele, no músculo e no tecido conectivo, os quais são

conjuntamente denominados de unidade neural de acupuntura (UNA ou neural acupuncture unit - NAU) (ZHOU et al, 2010; ZHANG et al, 2012). Os acupontos podem apresentar componentes neurais e neuroativos relativamente densos e concentrados, em que dependendo do estímulo da técnica de acupuntura utilizada, podem aumentar ainda mais a eficácia na resposta ao tratamento (ZHOU; HUANG; XIA, 2010; ZHANG et al, 2012).

Na prática clínica, os terapeutas usam de 10 a 15 agulhas em cada pessoa durante a sessão de acupuntura, sendo que o período de retenção da agulha (tempo em que a agulha permanece no acuponto) também varia, mas se prolonga por na média 25 minutos, para que assim possa ser obtido um melhor resultado no tratamento das diferentes doenças ou sintomas (MOLSBERG et al, 2008). Assim, é importante salientar que mesmo em animais a quantidade de agulhas e o tempo de tratamento é bastante variável, dependendo da técnica utilizada em cada trabalho. Pode-se encontrar diferentes tipos de manipulações e diferentes tempos de retenção da agulha, além de uso associado de aparelho elétrico (eletroacupuntura) ou moxabustão (bastão de artemísia aquecido) (GOLDMAN et al, 2010; KIM et al, 2009).

Neste estudo, optou-se por usar apenas um ponto de acupuntura e somente a agulha com estímulo manual (manipulação), sem uso de aparelho elétrico ou moxabustão, tento em vista que este procedimento é o mais utilizado clinicamente. Inicialmente, foi realizada uma padronização do tratamento com acupuntura no acuponto SP6, onde se observou que o melhor efeito antinociceptivo da acupuntura foi encontrado com 10 minutos de retenção da agulha (período de permanência da agulha inserida), avaliando-se o animal 15 minutos depois da retirada da agulha, no modelo de nocicepção induzida por ácido acético. Estudos afirmam que o uso de eletroacupuntura com baixas frequências (até 10Hz) liberam encefalina, betaendorfina e endomorfina, responsáveis pela analgesia de longa duração, sendo que o uso de altas frequências (100Hz) liberam dinorfina e produzem analgesia imediata (HAN, 2004). Em estudos clínicos, o efeito da acupuntura durou em torno de 216 minutos, quando foi utilizada no tratamento da dor neuropática causada por quimioterápicos em pacientes oncológicos (GUO et al, 1995). Portanto, parece que realmente a acupuntura apresenta um prolongado efeito analgésico. Não existem trabalhos que avaliem a relação da duração do efeito da acupuntura manual, porém essa etapa de experimentos foi importante para escolher

o tempo de maior inibição da resposta nociceptiva encontrada com a estimulação no SP6.

Os dados obtidos e descritos até então, sugerem que o efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto SP6 possa estar relacionado à inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios induzidos pelo ácido acético, pois esse teste é usado para avaliar dor visceral de origem inflamatória. O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético possui pouca especificidade, mas tem boa sensibilidade; assim, ele pode ser considerado uma ferramenta para avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de novos produtos (LE BARS et al, 2001). Sabe-se que a presença do ácido acético na cavidade peritoneal provoca uma irritação local e desencadeia a liberação de vários mediadores como a bradicinina (BK), SP e prostaglandinas (PGs), bem como algumas citocinas como IL-1 β (IKEDA et al, 2001). A resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético pode ocorrer pela liberação de citocinas, como TNF- α , IL-1 β e IL-8, de macrófagos residentes no peritônio e mastócitos (RIBEIRO et al, 2000). Além disso, pode haver aumento da concentração de glutamato e aspartato no líquido cerebrospinal (FENG et al, 2003).

O efeito antinociceptivo da acupuntura no modelo de nocicepção induzida por ácido acético foi confirmado em outro modelo de nocicepção aguda, mais específico e grandemente utilizado em pesquisas científicas, que é o teste da formalina. Utilizando o tempo de melhor efeito da acupuntura no acuponto SP6, verificamos que a acupuntura também foi capaz de reduzir a nocicepção neurogênica bem como a nocicepção inflamatória induzida pela injeção intraplantar de formalina.

Posteriormente, demonstrou-se que a inserção da agulha unilateral (na pata direita ou na esquerda) ou bilateral (pata direita e esquerda) no SP6 reduz a nocicepção induzida pelo ácido acético, e que os tratamentos não apresentam diferença estatística entre eles. No entanto, quando avaliamos os animais no teste de nocicepção induzida pela formalina, o tratamento com a inserção da agulha apenas no lado contralateral à injeção de formalina (agulha no acuponto SP6 apenas da pata esquerda) não foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pela formalina. Contudo, o tratamento com agulha no SP6 bilateral ou unilateralmente na pata direita (ipsilateral à injeção de formalina), foram capazes de reduzir significativamente o comportamento nociceptivo dos animais.

Ambos os modelos de nocicepção provocam a liberação de muitos mediadores relacionados com a reação inflamatória, como citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , prostaglandinas e bradicinina, que são responsáveis pelo processo de inflamação tecidual e pela sensibilização de nociceptores (MILLAN, 1999; LOESER; TREEDE, 2008). No entanto, baseado no fato de o modelo de nocicepção induzido pela formalina ser mais específico e localizado do que as contorções induzidas pelo ácido acético, pode-se perceber que a acupuntura parece apresentar efeito antinociceptivo apenas quando realizada ipsilateralmente à lesão, corroborando com outros autores (GOLDMAN et al, 2010).

5.1.2 Efeito dos pontos de acupuntura sobre modelos de nocicepção é diferenciado

É importante salientar que não se pode generalizar o efeito da acupuntura, pois a redução da dor, bem como o alívio de outros sintomas pelo uso da acupuntura, pode depender de fatores como a escolha dos acupontos. Muitos autores sugerem que a variação do efeito da acupuntura pela escolha de acupontos aconteça por diferentes motivos: pela distribuição dos pontos pelo corpo, sua ativação não específica em centros organizacionais, pela alta condutância elétrica dos pontos de acupuntura, pelo perfil de efeito contra lateral da acupuntura, bem como sua ontogenia, filogenia e função fisiológica no sistema de controle de crescimento (SHANG, 2011).

Nesse trabalho observou-se que a acupuntura manual no ponto SP6 teve um efeito antinociceptivo pronunciado comparado aos outros acupontos utilizados: ST35, BL57, KI3, GB39 e LR5. Embora alguns autores confirmem que o efeito da acupuntura não é específico, nosso trabalho sugere que a escolha dos pontos tem um papel importante no tratamento com acupuntura manual. Na verdade, apenas o ponto LR5 não apresentou efeito antinociceptivo em nenhuma das avaliações realizadas; no entanto, apenas o acuponto SP6 apresentou efeito antinociceptivo tanto no modelo de nocicepção visceral induzida pelo ácido acético, como nas duas fases da nocicepção induzida pela formalina. A seleção dos pontos de acupuntura, profundidade de agulhamento, técnica de manipulação, número e frequência das sessões são componentes importantes no tratamento com acupuntura. Todos esses componentes podem atuar em conjunto para alcançar a eficácia desejada pelo tratamento com acupuntura (ZHANG; BIAN; LIN, 2010).

Estudos sugerem que acupontos presentes nos mesmos segmentos corporais tem efeitos similares, e que acupontos presentes em diferentes segmentos corporais tem ações distintas. Um segmento da medula espinal pode controlar uma víscera através de neurônios viscerais, ou se relacionar com a pele, músculo, assim por diante, através do sistema somático. Segundo os autores, acupontos de diferentes segmentos nervosos têm influências distintas sobre as funções gástricas, apesar de todos eles pertencerem ao meridiano do estômago (segundo a MTC). Enquanto acupontos que estão no mesmo segmento nervoso que o estômago (órgão), pode modificar os movimentos gástricos (para revisão ver RONG et al, 2011). No entanto, no presente estudo, os efeitos antinociceptivos apresentados pelos acupontos estudados não foram similares, apesar de todos pertencerem ao mesmo segmento corporal.

Conquanto, apesar do acuponto SP6 ter apresentado maior efetividade nos modelos agudos de nocicepção usados neste trabalho, não se pode afirmar, com os presentes resultados, que o acuponto SP6 será sempre o ponto com maior efetividade no tratamento da dor, pois não se padronizou o tratamento com acupuntura para todos os outros pontos testados. Ou seja, com outros tempos de retenção da agulha e/ou outros tempos de espera após a retirada da agulha do acuponto para iniciar as avaliações, os acupontos testados (que não apresentaram ou que tiveram menos efeito antinociceptivo do que o acuponto SP6) podem apresentar desempenhos diferenciados.

A maior parte dos trabalhos que usam acupuntura se preocupa em demonstrar seu efeito específico, por isso é comum o uso de falsos pontos de acupuntura, ou outros tipos de controle que simulem o verdadeiro tratamento com acupuntura. Como citado na introdução, alguns pesquisadores também usam a inserção de agulhas de acupuntura em pontos controle à determinada distância do acuponto real ou ainda o agulhamento placebo sobre os pontos de acupuntura (ZHANG et al, 2012; ERNEST et al, 2011). Outros autores usam como “falsa-acupuntura” (um controle para seus tratamentos) o próprio acuponto utilizado no seu estudo, porém sem eletroacupuntura ou manipulação, apenas a inserção da agulha, como os estudos do Professor Lixing Lao, do Centro de Medicina Integrativa de Baltimore (LI et al, 2007). No atual estudo optou-se pelo uso de um “não-acuponto” (NA), considerando que este se localiza em um local onde não existe ponto de acupunta (MEDEIROS et al, 2003).

Observou-se que o uso do NA não produz efeito antinociceptivo nos modelos de nocicepção aguda pesquisados neste trabalho. O uso do NA é importante para mostrar que o efeito antinociceptivo da acupuntura não se deve ao estresse sofrido pelo animal para a colocação da agulha e também para mostrar que por algum motivo, ainda desconhecido, a acupuntura parece ter efeito apenas quando a agulha é inserida em pontos de acupuntura. Além disso, neste trabalho, os camundongos não foram anestesiados durante a estimulação de todos os pontos pesquisados, reforçando a idéia de que o efeito terapêutico observado não envolve ações inespecíficas geradas pela inserção das agulhas ou do estresse.

Como os acupontos são descritos individualmente na doutrina da MTC, muitos esforços tem sido realizados para identificar suas propriedades específicas (ZHOU et al, 2010; ZHANG et al, 2012). Neste sentido, descrevem-se diferenças importantes em nível anatômico, histológico, bioquímico e elétrico, tanto em humanos como em animais, entre os pontos tradicionalmente definidos como acupontos e os chamados "não-acupontos" (para revisão ver ZHOU et al, 2010; ZHANG et al, 2012). Assim, diferentes estudos sugerem que as propriedades "específicas" dos acupontos existem e são relativas, e isso pode nos ajudar em um melhor entendimento dos mecanismos essenciais da acupuntura, bem como no desenvolvimento de uma maneira mais eficiente de usar essa terapia (para revisão ver ZHOU et al, 2010; ZHANG et al, 2012).

Neste trabalho, a acupuntura apresentou efeito antinociceptivo, principalmente observado no acuponto SP6, que foi usado isoladamente, sem a associação de outros acupontos. Ainda para o tratamento utilizou-se estimulação manual na agulha, sem acrescentar outra técnica associada, como eletroterapia ou moxabustão. Apesar de não ser possível afirmar que o acuponto SP6 é o melhor acuponto para tratamento de todos os tipos de dor, pode-se afirmar que há, sim, diferença na escolha dos acupontos e que o NA não possui efeito antinociceptivo. Portanto, os presentes resultados sugerem que o efeito da acupuntura manual não pode ser considerado não específico e que esse efeito depende da seleção de acupontos.

5.1.3 Antinociceção causada por acupuntura manual no acuponto SP6 depende da integridade de fibras aferentes

Muitos autores afirmam que a estimulação da pele e dos músculos induz uma variedade de respostas somato-motoras e autonômicas, sugerindo fortemente que a acupuntura age através de fibras nervosas aferentes musculares ou cutâneas. Mas uma questão de interesse científico e prático considerável é: que tipos de fibras aferentes somáticas são estimuladas pela acupuntura e estão envolvidas em seus efeitos? Vários estudiosos tentam demonstrar a participação de diferentes fibras aferentes no efeito da acupuntura: fibras mielinizadas de grosso calibre dos tipos A α e A β (grupos I e II), fibras A δ , pouco mielinizadas de médio calibre (grupo III) e fibras do tipo C, finas e amielínicas (grupo IV) (para revisão ver KAGITANI; UCHIDA, HOTTA, 2010).

As fibras somáticas eferentes que inervam os músculos, pequenos ramos nervosos e terminações nervosas livres bem como receptores cutâneos encapsulados são encontrados nos tecidos onde são localizados os acupontos (ZHOU et al, 2010; LU, 1983; ZHANG et al, 2012). Muitos acupontos são constituídos de componentes neurais densos, como já citados anteriormente, dentre eles especialmente fibras nervosas, comparados às áreas onde não se encontram pontos de acupuntura (ZHOU et al, 2010). Segundo vários autores, o efeito da acupuntura manual depende do tipo de fibras aferentes estimuladas (A β , A δ e C). No entanto, os diferentes tipos de fibras aferentes nervosas que são ativadas pela acupuntura, dependem do método de manipulação e das diferenças na sensibilidade individual (ZHAO, 2008).

No presente estudo foi demonstrado que o tratamento neonatal com capsaicina preveniu o efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto SP6. Ou seja, a perda de fibras não mielinizadas (tipo C) impediu o efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6, indicando a importância dessas fibras no efeito da acupuntura. Também no presente estudo, foi possível observar que a injeção de lidocaína no local anatômico do acuponto SP6 foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6. Os resultados atuais diferem de trabalhos anteriores com acupuntura, onde demonstram que apesar de depletarem fibras sensíveis à capsaicina, a eletroacupuntura continuou apresentando efeito antinociceptivo em ratos no teste de retirada da cauda (LU et al, 1990). Outros trabalhos demonstram que a atividade analgésica da eletroacupuntura realizada

nos acupontos SP6 e ST36 em ratos não depende de fibras aferentes primárias (BAO et al, 1991).

De fato os efeitos da acupuntura são mediados pela ativação de fibras nervosas aferentes que inervam a pele e os músculos. Interessantemente, existe demonstração, através de eletrofisiologia, que a acupuntura manual realizada no acuponto ST36 ativa fibras nervosas pertencentes aos quatro grupos de fibras sensoriais em ratos, concluindo que a estimulação com acupuntura manual na pata traseira tem efeitos através do estímulo dessas fibras aferentes. Para tanto, os autores anestesiaram os animais, inseriram a agulha na pele e músculo no local do acuponto ST36, e manipularam a mesma. Assim, eles gravaram a atividade de um único ramo do nervo dissecado entre as vértebras lombares (L4 e L5) que inervam o membro posterior (KAGITANI; UCHIDA; HOTTA, 2010).

Entretanto, apesar de vários autores demonstrarem a participação de diferentes fibras no efeito da acupuntura manual, com os resultados do presente estudo, demonstra-se que as fibras C são essenciais para o efeito da acupuntura realizada no acuponto SP6. Pode-se incubar às diferenças entre os pontos utilizados e técnicas experimentais, por exemplo, existem diferenças entre o acuponto SP6 e ST36; a mais proeminente delas é que o ST36 é o ponto motor do músculo tibial anterior, possuindo assim uma ativação de componentes musculares mais importantes que o acuponto SP6. De qualquer forma, os dados do presente trabalho demonstram a importância da ativação de fibras nervosas periféricas aferentes mielinizadas e especialmente as não mielinizadas do tipo C no efeito da acupuntura no SP6, tendo elas um papel crucial na antinocicepção mediada pela estimulação do acuponto SP6.

5.1.4 Acupuntura manual no acuponto SP6 possui atividade antinociceptiva no modelo de neuropatia induzido pela LPNC

Os modelos animais de nocicepção utilizados até o momento foram de nocicepção aguda. A dor aguda tem função biológica de preservação, de integridade e defesa, pois denota uma lesão ou iminência de lesão tecidual. Porém, a dor crônica é uma das principais causas de incapacidade e afastamento do trabalho, perda de funcionalidade e da qualidade de vida (YENG; TEIXEIRA, 2004).

Dentro deste contexto, torna-se relevante o estudo da acupuntura manual no SP6 em um modelo experimental de dor crônica.

O modelo de neuropatia utilizado neste trabalho é bem caracterizado e extensamente empregado em investigação pré-clínica por induzir sinais comportamentais de dor neuropática semelhante a que ocorre em humanos. De fato, neste modelo é possível poupar um número suficiente de fibras de modo que o membro inferior não apresente grande prejuízo sensorial ou motor, o que poderia comprometer os resultados da avaliação comportamental (MCMAHON, 2006). Neste trabalho, a LPNC foi capaz de induzir expressiva hipersensibilidade mecânica em todos os camundongos que sofreram cirurgia (Figura 17).

Clinicamente, existem artigos que discutem que o tratamento com acupuntura para aliviar dores neuropáticas pode não ser eficaz. Por exemplo, o tratamento com eletroacupuntura no SP6 e ST36, ou LR3 e BL60, em pacientes com condições neuropáticas dolorosas nos membros inferiores, não apresentou diferença estatística quando comparado aos pacientes que receberam pseudo-eletroacupuntura (aplicação da agulha em pontos anatômicos neutros) (PENZA et al, 2011). Outros autores suportam evidências do efeito analgésico da acupuntura em casos de neuropatia diabética (BO et al, 2012; TONG; GUO; HAN, 2010), em pacientes que fazem uso de quimioterapia (DONALD; TOBIN; STRINGER, 2011) ou que tem neuropatia induzida por quimioterápicos (XU et al, 2010). Porém, é importante continuar a busca do verdadeiro efeito da acupuntura em modelos de nocicepção crônica em animais, para verificar o efeito analgésico da acupuntura em uma dor instalada. Muitos estudos mostram o efeito de terapias, como a acupuntura, em modelos animais de nocicepção evocados por estímulos nocivos em animais “normais”. Isto recebe grande crítica, pois este procedimento mostra o efeito antinociceptivo preventivo da acupuntura, não um efeito analgésico terapêutico em um caso de condição dolorosa preexistente. Além disso, pacientes humanos geralmente recebem acupuntura quando já apresentam dor, não preventivamente, ou seja, em condições saudáveis (KOO et al, 2002).

Considerando as observações clínicas e estudos experimentais que confirmam a efetividade da acupuntura realizada no acuponto SP6 no tratamento da dor neuropática (ALBAZAZ; WONG; HOMER-VANNIASINKAM, 2008; CHA et al, 2006; CIDRAL-FILHO et al, 2011; YANG et al, 2008), até o momento não existem relatos na literatura sobre o efeito da acupuntura manual neste acuponto

isoladamente, sem eletroestimulação ou associação com outros pontos, na redução da hipersensibilidade mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos.

No trabalho atual, a acupuntura manual realizada no acuponto SP6 foi capaz de reduzir significativamente a hipersensibilidade mecânica induzida pela LPNC, de forma terapêutica, desde o primeiro tratamento e posteriormente ao longo de todos os dias de avaliação. Muitos artigos científicos, dos últimos anos, mostram o efeito da acupuntura sobre dores crônicas, em especial neuropatias (CHA et al, 2010; CIDRAL-FILHO et al, 2011). Contudo, é importante ressaltar, que uma boa parte desses artigos se refere ao efeito da acupuntura associada à estimulação elétrica (CHA et al, 2010; MENG et al, 2011). Além disso, a maior parte dos estudos utiliza combinações de pontos, ao invés de investigar o efeito da estimulação de um ponto isolado (CHA et al, 2010; CIDRAL-FILHO et al, 2011). Mais especificamente, neste estudo, o efeito antinociceptivo demonstrado foi obtido pela estimulação manual, sem eletroestimulação, do ponto SP6 em aplicação unilateral no lado ipsilateral à cirurgia.

O experimento do tipo decurso temporal realizado no primeiro dia de tratamento com acupuntura manual no SP6 demonstrou que a ação antinociceptiva do acuponto iniciou imediatamente após o tratamento, e se manteve significativa por um período de sessenta minutos. Entretanto, ao passar dos dias, foi observado que quando o número de tratamentos de acupuntura aumentava, o efeito antinociceptivo desta terapia também aumentava. Assim, quando os animais receberam o quinto tratamento (no décimo dia após o início dos tratamentos) foi realizada uma nova avaliação do decurso temporal e observou-se um aumento do tempo de redução da hipersensibilidade mecânica induzida pela acupuntura no SP6, permanecendo por até 6 horas após o tratamento. Como mencionado anteriormente, o efeito antinociceptivo ou analgésico da acupuntura clinicamente pode durar por horas, em torno de 3,6 horas, porém pode durar até 5,2 horas (GUO et al, 1995).

Não obstante, a duração do efeito antinociceptivo da acupuntura ter sido curta na primeira aplicação e aumentar no quinto tratamento, no decorrer do tratamento crônico, as repetidas intervenções estenderam ainda mais a meia-vida deste efeito por muitas horas, sem induzir tolerância (Figura 17). É importante ressaltar que, a partir da oitava sessão, o efeito da acupuntura manual no SP6 se manteve significativo mesmo nos dias em que os animais não foram tratados (efeito de 24-

48hs) e após o último tratamento, se estendeu por um período de quatro dias (96 horas). Este dado é muito relevante, uma vez que um problema comum que ocorre durante a utilização em longo prazo de terapias farmacológicas para o tratamento da dor, como no caso do tratamento opióide, é a tolerância, definida como a diminuição do efeito da droga como consequência de uso prolongado (PORTENOY, 1999). O tempo de analgesia da acupuntura encontrado aqui é um período superior à meia-vida da maior parte dos medicamentos analgésicos utilizados para o tratamento da dor neuropática atualmente, como por exemplo, antidepressivos (amitriptilina, nortriptilina, desipramina), anticonvulsivantes (gabapentina, carbamazepina, lidocaína) e opióides (morfina, metadona, tramadol), uma vez que todos esses fármacos precisam ser administrados nos pacientes diariamente, além de provocarem efeitos adversos, apresentarem contra-indicações e ainda podem levar ao desenvolvimento de tolerância (JACKSON, 2006).

Ainda com relação aos resultados expostos neste trabalho, foi possível observar que a acupuntura manual realizada no acuponto SP6 reduziu de forma significativa a hipersensibilidade térmica ao calor induzida pela LPNC, porém não a hipersensibilidade ao frio. Estudos demonstram que a eletroacupuntura realizada em combinações de pontos de acupuntura, reduz a hipersensibilidade mecânica, avaliado com filamentos de von Frey e a hipersensibilidade térmica, avaliado com placa quente, em animais submetidos à lesão por constrição crônica, e que isso se deve a redução da expressão de receptores P2X3 na medula espinal em ratos (YU; ZHAO; LUO, 2013). Além disso, a eletroacupuntura, realizada nos pontos SP9 e ST36, combinada com uma dose sub-ativa de MK-801 (antagonista dos receptores glutamatérgico do tipo NMDA) no tratamento de neuropatia induzida por estreptozotocina, reduziu a hipersensibilidade mecânica (avaliada no von Frey) e térmica (avaliada no Hargreaves) (HWANG et al, 2011). Porém, estudos com neuropatia induzida por secção do nervo nos níveis de S1 e S2 na medula espinal, demonstram que a eletroacupuntura realizada no acuponto ST36 foi capaz de reduzir a alodínia ao frio (hipersensibilidade) avaliada pelo teste de imersão da cauda (sensibilidade ao frio). No entanto, os mesmos autores demonstraram que a acupuntura manual foi usada como controle, pois não apresentou efeito em reduzir os parâmetros dos animais no teste de imersão da cauda (PARK et al, 2010). Os resultados apresentados no presente trabalho evidenciam que a acupuntura realizada no acuponto SP6, além de não induzir tolerância, foi capaz de reduzir a hipersensibilidade

térmica ao calor ao longo dos dias de avaliação, mas não foi capaz de reduzir a hipersensibilidade ao frio.

Finalmente, este estudo demonstrou que a acupuntura em não-acuponto não foi capaz de inibir a hipersensibilidade mecânica ou térmica induzida pela LPNC. De acordo com os dados expostos neste trabalho anteriormente (dados agudos), bem como de acordo com experimentos realizados em modelos animais e em seres humanos, nos quais a estimulação de não-acupontos não apresentou o mesmo efeito analgésico ou antinociceptivo do que o estímulo realizado em acupontos (HUANG et al, 2009; LI et al, 2005; TABOSA et al, 2002; da SILVA et al, 2011).

Assim, os resultados aqui apresentados ampliam os dados da literatura e demonstram claramente o efeito da estimulação manual com acupuntura no acuponto SP6 na inibição da hipersensibilidade mecânica e térmica ao calor no modelo de dor neuropática induzida pela LPNC em camundongos.

5.2 PARTE II: ANTINOCICEPÇÃO CAUSADA POR ACUPUNTURA MANUAL NO SP6 DEPENDE DE NEUROTRANSMISORES ENDÓGENOS E SEUS RECEPTORES E ATIVA ÁREAS ESPECÍFICAS NO ENCÉFALO

Diversos autores mostram que moléculas endógenas e seus receptores estão implicados na analgesia da acupuntura, como peptídeos opióides (receptores μ , δ e κ), colecistocinina octapeptídeo (CCK-8), glutamato (receptores NMDA e AMPA/Kainato), 5-hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT) e noradrenalina (HAN, 2004; ZHAO, 2008). Dentre as moléculas descritas, os peptídeos opióides e seus receptores possuem um papel importante na analgesia por acupuntura e sua atividade é discutida por muitos autores (ver revisão em HAN, 2011; ZHAO, 2008). Por isso, buscamos através da utilização de ferramentas farmacológicas, analisar quais possíveis mecanismos poderiam estar envolvidos no efeito da acupuntura manual no ponto SP6, e pode-se observar que receptores kapa opióides, dopaminérgicos, colinérgicos e adenosinérgicos (A1) são importantes no estabelecimento do efeito antinociceptivo do SP6.

Os mecanismos neurofisiológicos fundamentais pelos quais a acupuntura manual exerce seus efeitos, incluindo o efeito analgésico, precisam ser extensamente estudados. Quanto mais entendermos os mecanismos que são relevantes para os efeitos dessa técnica, mais

seremos capazes de melhorar o tratamento, aumentando a efetividade da acupuntura. Por enquanto, sabe-se que a analgesia e/ou antinocicepção alcançada com a acupuntura manual depende de receptores A1 adenosinérgicos (GOLDMAN et al, 2010). Quando o terapeuta insere a agulha no ponto de acupuntura, essa agulha pode induzir a liberação de ATP por células locais. Esse ATP pode ser metabolizado em adenosina extracelular por ectonucleotidases, as quais catalizam a hidrólise de ADP e AMP em adenosina. Assim, a acupuntura pode induzir a ativação de receptores A1, produzindo um efeito de inibição da dor (SAWYNOK; REID; POON, 1998; GOLDMAN et al, 2010).

Para confirmar a participação dos receptores adenosinérgicos, administrou-se um antagonista adenosinérgico A1 (DPCPX) intraperitonealmente, mas nesta condição não foi observada reversão do efeito antinociceptivo da acupuntura manual no SP6. Contudo, quando se administrou o mesmo antagonista no local do tratamento (injetado intradermicamente no local anatômico do ponto SP6), o DPCPX foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo da acupuntura manual no SP6. Uma possível explicação para os dados obtidos é a concentração do DPCPX (quando injetado intraperitonealmente) que pode não ter sido suficiente para bloquear receptores adenosinérgicos da periferia e assim bloquear seu efeito antinociceptivo. Além disto, o efeito da acupuntura em nível central parece depender também de outros mecanismos (MA, 2004; ZHAO, 2011). A ativação de receptores A1 periféricos desempenha um papel na regulação da hipernocicepção, especialmente inflamatória, através de um mecanismo que envolve a sinalização intracelular por NO/cGMP/PKG/KATP (óxido nítrico, monofosfato cíclico de guanosina, proteína quinase G e ATP sensível a potássio) (LIMA et al, 2010). Os receptores A1 desempenham um papel fisiológico na inibição da entrada nociceptiva ao nível espinal em ratos, e também contribuem para o efeito antinociceptivo da morfina espinal (WU et al, 2005). Sua ativação nas fibras sensoriais e a sinalização através dos diferentes caminhos podem favorecer a liberação de mediadores químicos em nível espinal ou supra-espinal pela adenosina periférica liberada pela acupuntura (GOLDMAN, 2010, LIMA et al, 2010). Contudo, é importante salientar que a liberação de ATP, e consequentemente de adenosina, na periferia pela inserção e manipulação da agulha no local do ponto de acupuntura é essencial para o efeito da acupuntura no acuponto ST36 (TAKANO et al, 2012). Essa liberação de ATP/adenosina no local do acuponto parece também ser essencial para o efeito antinociceptivo da acupuntura realizada no SP6.

Os opióides, substâncias com efeito similar a morfina e antagonizados por naloxona, estão entre as drogas mais usadas no controle da dor. Induzem a analgesia em humanos e antinocicepção em animais porque atuam em receptores específicos, alterando a resposta orgânica a estímulos nocivos (FOLEY; INTURISSI, 1987; YAKSH, 1999). Os principais efeitos analgésicos dos opióides decorrem da ação deles sobre receptores do tipo MOP ou *mu* (μ), KOP ou *kappa* (κ) e DOP ou *delta* (δ) (KIEFFER; EVAN, 2009), os quais estão extensamente distribuídos pelo SNC (YAKSH, 1999) e em células da periferia (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; WITTERT; HOPE; PYLE, 1996). O efeito analgésico produzido pela eletroacupuntura em humanos e animais em diferentes acupontos, como *ZuSanLi* (ST36) e *SanYinJiao* (SP6), está associado ao aumento de opióides endógenos no SNC (HAN, 2003; ZHAO, 2008). Além deste, vários estudos mostram que a analgesia por acupuntura é mediada por peptídeos opióides, pois a analgesia causada pela acupuntura foi impedida pelo uso de naloxona (CHENG; POMERANZ, 1980; MAYER; PRICE; RAFFI, 1977) e o uso de CCK-8 (colecistoquinina octapeptídeo, um antagonista opióide endógeno) intratecal ou intracerebroventricular bloqueia a analgesia por morfina (agonista opióide) e por eletroacupuntura (HAN; DING; FAN, 1986). Neste trabalho, apesar de a naloxona inicialmente não ter prevenido o efeito da estimulação no SP6, em doses maiores, esse antagonista opióide, preveniu o efeito da acupuntura. Em doses mais baixas a naloxona parece ser mais seletiva para receptores do tipo μ opióide (GOODMAN; GILMAN, 1996), portanto utilizaram-se também antagonistas específicos para cada receptor. Observou-se que os receptores opióides *kappa* são importantes para a efetividade da acupuntura manual realizada no acuponto SP6. Os receptores *kappa*, cujos ligantes endógenos preferenciais são dinorfinas, possuem um número relativamente pequeno de efeitos indesejáveis e sua importância para a redução da dor tem contribuído para a pesquisa de novos fármacos (WOOD, 1988; BOWEN et al, 2003). Alguns autores já tem demonstrado que a eletroacupuntura no acuponto SP6 reduz significativamente a nocicepção em ratos com dismenorréia e isso parece estar intimamente associado ao aumento da expressão de receptores *kappa*-espinais e a expressão de encefalina ou beta endorfina na PAG (REN et al, 2012).

A dopamina é um neurotransmissor que pode participar de processos de modulação da dor tanto em níveis espinais quanto centrais, e agonistas dopaminérgicos podem aumentar o limiar de dor de maneira dose-dependente (CHUDLER; DONG, 1995). Têm-se demonstrado

também a participação da dopamina no efeito da acupuntura. A eletroacupuntura realizada nos pontos Zusanli (ST36) e Shangjuxu (ST37) possuem efeito antinociceptivo via ativação de neurônios da PAG e os sistemas histaminérgico, dopaminérgico e noradrenérgico estão relacionados a esses efeitos (MUROTANI et al, 2010). Além disso, o uso da acupuntura também é eficaz em tratamentos de doenças como o Parkinson (distúrbio degenerativo crônico), na qual aumenta a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos na substância negra e os seus terminais no estriado dorsolateral (PARK et al, 2003). Neste estudo, o antagonista dopaminérgico (sulpirida) foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo do tratamento com acupuntura, demonstrando a participação desse sistema endógeno na redução da nocicepção induzida pela acupuntura manual no acuponto SP6.

A hipótese de que a acupuntura ativa o eixo HPA sugere um envolvimento colinérgico no efeito anti-inflamatório e antinociceptivo da acupuntura (CHO et al, 2006). Para verificar essa possibilidade, utilizaram-se ferramentas farmacológicas e observou-se que os antagonistas colinérgicos preveniram o efeito antinociceptivo da acupuntura. Ou seja, ambos receptores, muscarínicos e nicotínicos, estão envolvidos no efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto SP6. A acetilcolina é um mediador químico de sinapses no SNC, no SNP e também na junção neuromuscular, e juntamente com seus receptores e o aparato enzimático responsável por sua síntese e degradação (acetilcolinesterase), constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica (BRUNEAU; AKAABOUNE, 2006). A classificação dos subtipos de receptores colinérgicos foi baseada na sua capacidade de se ligar à nicotina e à muscarina, respectivamente, e na resposta à ativação colinérgica com alta afinidade (DALE, 1914). Tanto os receptores nicotínicos (ionotrópicos), como os muscarínicos (acoplados a proteína G) são amplamente distribuídos por diversos sistemas biológicos, onde participam de várias funções vitais (TAYLOR; BROWN, 1994). A acetilcolina pode mediar a dor através de ambos os tipos de receptores e seus subtipos, uma vez que os agonistas dos receptores colinérgicos, bem como inibidores da acetilcolinesterase podem reduzir a dor em humanos e animais (JONES; DUNLOP, 2007). Existem vários relatos que descrevem o papel do sistema colinérgico na antinocicepção pela acupuntura. Alguns autores têm demonstrado que a acupuntura auricular pode ter efeito antinociceptivo e anti-inflamatório por ativação de receptores muscarínicos periféricos (subtipo M2), especialmente aqueles no local da inflamação (CHUNG; ZHANG; ZHANG, 2011). A acupuntura provoca um aumento da acetilcolina no líquido céfalo

raquidiano e este aumento está relacionado à potencialização da analgesia (HE; Xu; JIANG, 1979). Níveis aumentados de acetilcolina foram encontrados no *locus coeruleus*, na Rafe (GE; HUANG, 1979), no hipotálamo e no núcleo caudado (WANG; YU; LIU, 1979) de ratos durante a antinocicepção causada por eletroacupuntura. Além disso, foi observada redução da acetilcolinesterase na substância gelatinosa (AI et al, 1979). O bloqueio de receptores muscarínicos com atropina (antagonista muscarínico) em ratos e coelhos (HAN, 1979) e com hioscina (substância derivada da escapolamina, antagonista muscarínico) em coelhos (HE et al, 1979) bloqueou a analgesia induzida pela acupuntura, enquanto que a fisostigmina (inibidor da acetilcolinesterase) potencializou a analgesia por acupuntura em ratos (HAN, 1979; GUAN et al, 1979; AI, 1979).

Tem sido demonstrado que a L-arginina-NO derivada especialmente do núcleo grácil contribui para as respostas neuronais da eletroacupuntura através da via espinotalâmica (MA; LI, 2002). As substâncias que podem participar da analgesia pela acupuntura incluem serotonina, catecolaminas, produtos químicos inorgânicos e ácidos aminados tais como glutamato e GABA, os quais podem ser aumentados ou reduzidos, principalmente no SNC, após o uso da acupuntura. Todas essas substâncias também podem mediar alguns dos efeitos cardiovasculares e analgésicos da acupuntura, mas atualmente seu papel ainda é pouco compreendido (FOSTER; SWEENEY, 1987; para revisão ver ZHAO, 2008). Apesar de ter sido observado, neste trabalho, que não houve participação de receptores serotoninérgicos e adrenérgicos no efeito antinociceptivo da acupuntura manual no acuponto SP6, esse fato pode ter ocorrido pelo modelo nociceptivo utilizado, doses dos antagonistas usados neste estudo ou pela via de administração dos antagonistas, porque se a administração fosse via intratecal, por exemplo, o resultado poderia ser diferente.

Uma outra forma de avaliarmos os mecanismos neurobiológicos endógenos, por quais a acupuntura no acuponto SP6 pode estar apresentando seu efeito antinociceptivo, é verificar a atividade da proteína c-Fos, em áreas centrais relacionadas a dor, de animais submetidos ou não à estimulação com acupuntura no acuponto SP6 e verificar se o tratamento com acupuntura pode modificar a expressão dessa proteína.

O processamento da dor, como ela ascende a centros superiores e as respostas descendentes em relação a ela são eventos grandemente descritos por vários autores (MILLAN, 2002). Existem duas principais

vias ascendentes de dor: o trato espinoparabraquial e o trato espinotalâmico. O primeiro tem origem no corno dorsal superficial da medula espinal e se projeta para o núcleo parabraquial, se conectando a áreas do encéfalo envolvidas principalmente na transmissão emocional da dor, enquanto o último trato se origina no corno dorsal superficial e profundo e se projeta para o tálamo com conexões com as áreas corticais envolvidas na discriminação sensorial e emocional da dor. Observações clínicas e estudos experimentais sugerem que as vias que levam as informações da acupuntura são entrelaçadas com os caminhos da dor. Uma vez que a informação da dor ou da acupuntura é gerada, a mesma ascende para centros superiores encefálicos (ZHAO, 2008).

Vários locais supra-espinais participam do sistema modulatório descendente da dor e exercem grandes efeitos na resposta inibitória das mensagens nociceptivas ao nível da medula espinal. O bulbo rostral ventral, incluindo o núcleo magno da Rafe (Rafe) entre outros, desempenham um papel crucial na modulação descendente da dor. A Rafe é uma das principais fontes serotoninérgicas descendentes do tronco cerebral e o *locus coeruleus* (LC) envia projeções noradrenérgicas descendentes para o corno dorsal da medula espinal (FIELDS; BASBAUM, 1978; CLARK; PROUDFIT, 1991; GEBHART et al, 1983). Estudos sugerem que a eletroacupuntura ativa neurônios espinais que transmitem sinais da acupuntura para o encéfalo e ativa o sistema inibitório descendente da dor, além de inibir a expressão de cFos na área medial das lâminas I-II da medula espinal e também a hiperalgesia (LAO et al, 2001). O núcleo paragigantocelular reticular do sistema adrenérgico descendente também parece ser ativado pela estimulação com acupuntura, pois a administração de fentolamina intratecal (bloqueador α -adrenérgico) impediu o efeito analgésico da acupuntura. Além disso, os autores associavam o aparecimento de potenciais de ação, nos neurônios desse núcleo, durante a acupuntura (TAKESHIGE et al, 1992). Este núcleo pode transmitir informações para uma estrutura noradrenérgica (LC), ou algum outro núcleo do tronco cerebral também noradrenérgico cujos axônios se projetam para a medula espinal. Outros autores sugerem também que a analgesia por acupuntura depende eventualmente da PAG (serotonérgico), demonstrando que os níveis de serotonina estão aumentados em mastócitos e plaquetas após a realização da acupuntura (SOUVANNAKITTI et al, 1993; WU; DENG, 1993). Isto pode explicar porque os efeitos da acupuntura podem ser de longa duração (MA, 2004). Não se observou participação de receptores adrenérgicos e serotonérgicos com as avaliações utilizadas, porém sabe-se atualmente

que nenhum desses núcleos possui somente neurônios que liberem um tipo de neurotransmissor. Portanto, vias dopaminérgicas na PAG (MUROTANI et al, 2010) e colinérgicas no *locus coeruleus* e na Rafe (GE; HUANG, 1979), entre outros, podem contribuir para o processamento e transmissão dos impulsos originados pela acupuntura.

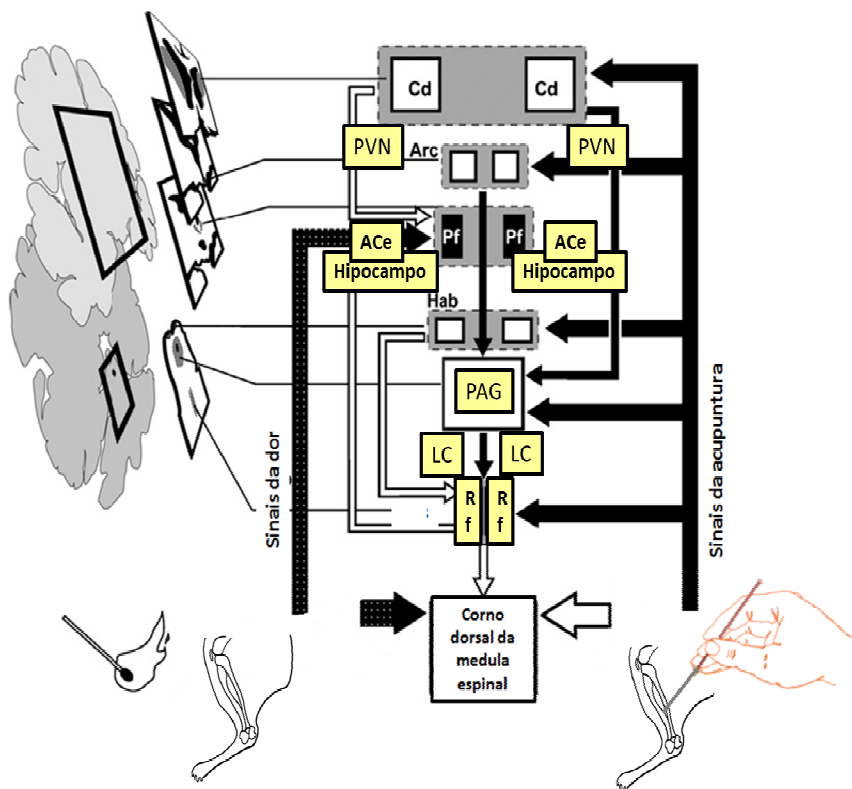
Algumas propostas de esquemas para compreensão das vias centrais na analgesia por acupuntura são encontradas na literatura, como exemplificado na Figura 36. Porém, como existem entre os núcleos envolvidos intrincados circuitos neurais, mesmo os dados cumulativos da analgesia por acupuntura são insuficientes para fazer um esquema claro de interação das áreas envolvidas (ZHAO, 2008). Nesse estudo, os animais tratados com acupuntura manual no acuponto SP6 tiveram aumento da expressão de proteína c-Fos no LC, PAG, Rafe, PVN, amígdala central e hipocampo (áreas CA1, CA2, CA3, CA4 e GD). Por essa razão, essas áreas foram acrescentadas ao esquema da Figura 36.

Estudos fisiológicos e de imagem fornecem evidências sobre os mecanismos neurofisiológicos da analgesia por acupuntura (WANG et al, 2008; ZHANG, 2004; HUI et al, 2010). A maioria dos núcleos envolvidos nos efeitos analgésicos da acupuntura, como os encontrados nesse estudo, são constituintes do sistema inibitório descendente da dor e uma variedade de moléculas participa dessa atividade (MILLAN, 2002). Estudos suportam a hipótese de que o efeito da acupuntura no encéfalo vai além do efeito oriundo da atenção do paciente sobre o tratamento ou a estimulação somatossensorial das agulhas de acupuntura, pois se pode também observar diminuição da ativação neuronal em alguns centros superiores durante a estimulação com acupuntura (HUI et al, 2010).

Observações clínicas e estudos experimentais sugerem que as vias de sinalização da acupuntura estão associadas às vias de dor. Há convergência de impulsos originados dos locais envolvidos na dor e dos locais ativados pela acupuntura, na medula espinal e depois em muitas áreas centrais. Os locais principais são o tálamo, LC, PAG, hipotálamo, hipocampo, amígdala, entre outros (MA, 2004; ZHAO, 2008).

É importante ressaltar que os resultados conflitantes entre o presente estudo e o de outros pesquisadores, tanto sobre os efeitos da acupuntura na dor, como os mecanismos envolvidos nesse contexto, podem ser explicados pela diferença no protocolo experimental (modelo de dor, acupuntura manual ou eletroacupuntura e escolha de acupontos).

Figura 36: Circuito central da analgesia por acupuntura.



Os núcleos fundamentais estão envolvidos no processamento de sinais a partir de pontos de acupuntura. Sinais dos acupontos são transmitidos para o encéfalo através do funículo ventrolateral (VLF) para ativar e desativar os diferentes núcleos e regiões. Abreviaturas: Cd - núcleo caudado; Arc - núcleo arqueado; PVN - núcleo paraventricular do hipotálamo; Pf - núcleo parafascicular; ACe - núcleo central da amígdala; Hab- núcleo habenular; PAG - substância cinzenta periaquedutal; LC – locus coeruleus; Rf, núcleo magno da Rafe. Seta sólida: entrada excitatória; seta aberta: entrada inibitória.

Fonte: Adaptado de Zhao, 2008.

5.3 PARTE III: ACUPUNTURA REALIZADA NO ACUPONTO SP6 REDUZ INFLAMAÇÃO EM MODELO DE PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA POR AUMENTO DE CITOCINA ANTI-INFLAMATÓRIA IL-10 E CORTICÓIDES ENDÓGENOS

Segundo a Medicina Tradicional Chinesa, a saúde depende da manutenção, formação e circulação de Yin e Yang, e o resultado da falta de equilíbrio entre eles é o desenvolvimento de doenças. Os processos inflamatórios, por exemplo, da cavidade peritoneal ou região abdominal, promovem uma "síndrome de esgotamento" que podem mostrar sinais de prostração (Qi), astenia (Yin) e disfunção (Yang), como resultado de uma infecção. Assim, a acupuntura pode tratar a "síndrome do esgotamento" reforçando o sistema imune contra a infecção por supressão e/ou neutralizar os agentes patogênicos, assim como através da inibição da produção de mediadores inflamatórios (HUANG et al, 2002; PATWARDHAN et al, 2005; CHO et al, 2006; WANG; XU, LEWIN, 2009).

A acupuntura manual realizada no acuponto SP6 provocou pronunciada ação anti-inflamatória em camundongos submetidos à peritonite induzida por carragenina. Além disso, neste estudo observou-se a capacidade do acuponto SP6 de inibir significativamente a infiltração de leucócitos, a permeabilidade vascular, a atividade da MPO e aumentar os níveis de citocinas IL-10 no fluido peritoneal, bem como a possível contribuição de glicocorticóides endógenos nestes efeitos anti-inflamatórios.

A inflamação aguda envolve mudanças microvasculares com aumento da permeabilidade vascular, exsudato inflamatório, incluindo aumento de proteínas plasmáticas, migração celular (principalmente neutrófilos) e aumento de mediadores químicos endógenos no local da lesão (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Entre os modelos experimentais, a peritonite induzida por carragenina é um modelo de inflamação aguda bem caracterizado, grandemente utilizado para testar novas terapias anti-inflamatórias que permitem a quantificação e correlação dos resultados dos parâmetros inflamatórios (BEEKHUIZEN; VAN FURTH, 1993; MCCOLL; SHOWELL, 1994; DOWNEY; FIALKOW; FUKUSHIMA, 1995).

Neste trabalho foi possível observar que o tratamento com acupuntura no SP6 reduziu o influxo de leucócitos, predominantemente de neutrófilos, 4 horas após a indução da peritonite. A avaliação do

fluido peritoneal também revelou que o acuponto SP6 reduziu o extravasamento peritoneal e a atividade da enzima MPO. Estes achados corroboram com relatos anteriores onde a acupuntura, realizada em outros acupontos como Yintang (HN3), Houhai ou Changqiang (GV1), Baihui (GV20) e Zusanli (ST36), respectivamente, produzem efeitos anti-inflamatórios sobre a peritonite induzida por carragenina e septicemia induzida por ligação cecal em ratos. Na verdade, estes pesquisadores relataram que a acupuntura inibiu a migração de neutrófilos na peritonite induzida por carragenina e restabeleceu parcialmente a migração de neutrófilos da cavidade peritoneal após sepse (SCOGNAMILLO-SZABÓ et al, 2004; SCOGNAMILLO-SZABÓ; BECHARA; CUNHA, 2005).

O agulhamento do não-acuponto (NA) não afetou a migração celular induzida pela injeção de carragenina, nem os demais parâmetros inflamatórios avaliados, portanto, acredita-se que o efeito anti-inflamatório foi específico do SP6. De fato, a acupuntura tem sido utilizada para o tratamento de doenças auto-imunes e inflamatórias, como por exemplo a asma, usando acupontos que aumentam a energia vital e regulam o sistema imune, como o SP6 (YIM et al, 2010).

Vários mediadores pró-inflamatórios estão envolvidos na inflamação induzida por carragenina, como neuropeptídeos, prostaglandinas, óxido nítrico e citocinas (de CASTRO FRANÇA, 2007). No que diz respeito à participação de citocinas pró-inflamatórias neste modelo, é estabelecido que os leucócitos, entre outras células, produzem IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (PEREIRA; MEDEIROS; FRÖDE, 2006). Por outro lado, os macrófagos produzem IL-10, uma citocina anti-inflamatória que desempenha um papel importante no controle da inflamação (de CASTRO FRANÇA, 2007). De fato, os camundongos submetidos à peritonite por carragenina apresentaram aumento dos níveis de IL-1 β e TNF- α ; em contraste, houve redução dos níveis de IL-10 no fluido peritoneal.

No presente estudo, a acupuntura manual realizada no acuponto SP6 não modificou os níveis IL-1 β e TNF- α no líquido peritoneal, mas restabeleceu os níveis de IL-10. Na verdade, alguns autores relatam em seus trabalhos que a acupuntura tem um interessante efeito de reduzir as citocinas inflamatórias. Por exemplo, Scognamillo-Szabó, Bechara e Cunha (2005), mostraram que a acupuntura manual reduziu os níveis de IL-1 β no exsudato peritoneal, em modelo de peritonite induzida por carragenina em ratos. Os autores utilizaram uma combinação do acupontos (Yin Tang – entre os olhos, Hou Hai – entre a cauda e o ânus

e Bai Hui – no espaço lombo sacral) e apesar de mostrarem redução nos níveis de IL-1 β , o tratamento não modificou a quantidade de TNF- α e de IL-10 no exsudato peritoneal (SCOGNAMILLO-SZABÓ; BECHARA; CUNHA, 2005). Até o presente momento não existe uma explicação clara para os resultados discrepantes, mas o tipo de estimulação da acupuntura (pontos escolhidos) e as espécies animais envolvidas podem ser responsáveis pela diferença encontrada nos trabalhos.

O efeito anti-inflamatório da acupuntura no acuponto SP6 pode ser atribuído ao aumento da liberação de IL-10, a qual tem recebido muita atenção por causa de suas propriedades anti-inflamatórias. Devido a estes resultados, mais estudos foram realizados para tentar confirmar essa idéia e verificar que células seriam responsáveis pela liberação da IL-10, e eles serão discutidos posteriormente.

Os dados do presente estudo demonstraram ainda que a dexametasona, um glicocorticóide sintético com potente atividade anti-inflamatória e imunossupressora, também inibiu o influxo de leucócitos e neutrófilos e a permeabilidade vascular no fluído peritoneal dos camundongos que receberam carragenina. No entanto, diferentemente da acupuntura, a dexametasona reduziu citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), mas não restabeleceu os níveis de IL-10 no fluído peritoneal dos camundongos com peritonite. Portanto, este estudo sugere que os efeitos anti-inflamatórios da acupuntura no SP6 e da dexametasona parecem envolver diferentes mecanismos.

Outro achado importante no presente estudo foi a demonstração de que a adrenalectomia foi capaz de prevenir significativamente a ação anti-inflamatória do acuponto SP6, mas não a ação anti-inflamatória produzida pela dexametasona na peritonite. A dexametasona bem como outros fármacos anti-inflamatórios age diretamente em seus mecanismos, que são estabelecidos em estudos laboratoriais antes do início do seu uso clínico. Entretanto, a acupuntura parece atuar como um estopim para o organismo iniciar/reiniciar e/ou parar a produção e liberação de substâncias que ele sempre foi capaz de produzir e liberar, mas que por algum motivo não estava fazendo, ou estava liberando, porém de forma insuficiente. Isto vem ao encontro com a teoria de reequilíbrio energético, segundo a MTC (PATWARDHAN et al, 2005; WANG; XU; LEWIN, 2009). Estes dados sugerem que a acupuntura manual no SP6, de alguma forma, estimula as glândulas suprarrenais, regulando posteriormente a peritonite. Nesta mesma linha, sabe-se que a eletroacupuntura aumentou glicocorticóides plasmáticos endógenos e

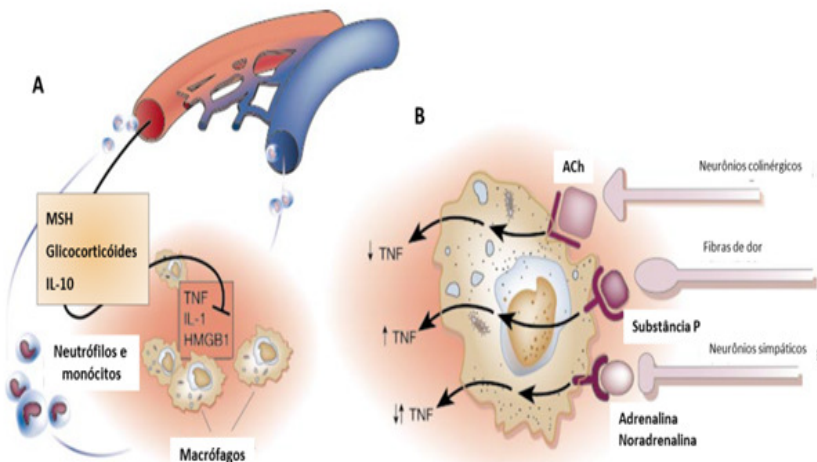
suprimiu o edema na pata inflamada por adjuvante completo de Freund (CFA) em ratos (LI et al, 2007; LI et al, 2008; ZHANG (a) et al, 2004). Uma variedade de estudos sugere que a informação inflamatória é transmitida através de neurônios sensoriais para o hipotálamo, onde os sinais são processados, resultando na saída de sinais anti-inflamatórios através do sistema nervoso autonômico. Vários autores estudam a possibilidade de a acupuntura estar envolvida como um modulador do sistema imune (EGOZI et al, 2003; DINKEL; MACPHERSON; SAPOLSKY, 2003; MOSSER; ZHANG, 2008). Evidências científicas atuais ainda estão para ser produzidas, porém estudos que falam de neurobiologia (TRACEY, 2002; CABIOĞLU; CETIN, 2008) e reflexos autonômicos (DINKEL; MACPHERSON; SAPOLSKY, 2003) podem ser a base para a compreensão do mecanismo básico do reflexo neuroimune envolvido no efeito da acupuntura.

Embora o efeito analgésico ou antinociceptivo e anti-inflamatório da acupuntura esteja bem documentado, pouco se sabe sobre a sua base biológica. Para investigar os mecanismos subjacentes da analgesia por acupuntura, muitos estudos foram realizados utilizando eletroacupuntura ou acupuntura manual em vários modelos animais experimentais (CHENG; POMERANZ, 1981; HAN, 2004; da SILVA et al, 2011). Os mecanismos envolvidos no efeito da acupuntura podem ser explicados por bases moleculares e neurofisiológicas que envolvem o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (MORI et al, 2002; CHO et al, 2006). O controle inibitório descendente da dor parece estar envolvido, assim como um mecanismo anti-inflamatório por vias neuroimunes e ativação colinérgica (CHO et al, 2006; TRACEY, 2002).

As citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas na interação entre o sistema imune e o cérebro, através do sistema nervoso autônomo (DINKEL; MACPHERSON; SAPOLSKY, 2003; CABIOĞLU; CETIN, 2008). O TNF- α é capaz de amplificar e prolongar a resposta inflamatória e dano tecidual (TRACEY, 2002) ativando outras células a produzir citocinas como a IL-1 e o HMGB1 (high mobility group box 1), além de outros mediadores químicos como eicosanóides e óxido nítrico, promovendo dessa forma o aumento da inflamação (TRACEY, 2002). Alguns mecanismos endógenos são capazes de impedir a secreção exacerbada de TNF- α , bem como de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como o eixo hormonal adreno-corticotrópico-glicocorticóide (HPA), a via anti-inflamatória simpática (adrenalina e noradrenalina) e a atividade de outros fatores anti-inflamatórios produzidos durante a resposta inflamatória normal. Também a citocina

anti-inflamatória IL-10 e o TGF β (fator de transformação de crescimento β) são capazes de suprimir, independentemente, a ativação de macrófagos e a liberação de citocinas inflamatórias (TRACEY, 2002, CZURA; TRACEY, 2005). A via colinérgica anti-inflamatória (ver Figura 37) também inibe a produção de TNF α , principalmente em macrófagos, pois as terminações nervosas parassimpáticas liberam acetilcolina, ativando um reflexo neuro-imune que pode suprimir a liberação dessas citocinas inflamatórias (TRACEY, 2002; CZURA; TRACEY, 2005; CABIOĞLU; CETIN, 2008).

Figura 37: Vias anti-inflamatórias - difusa e neural.

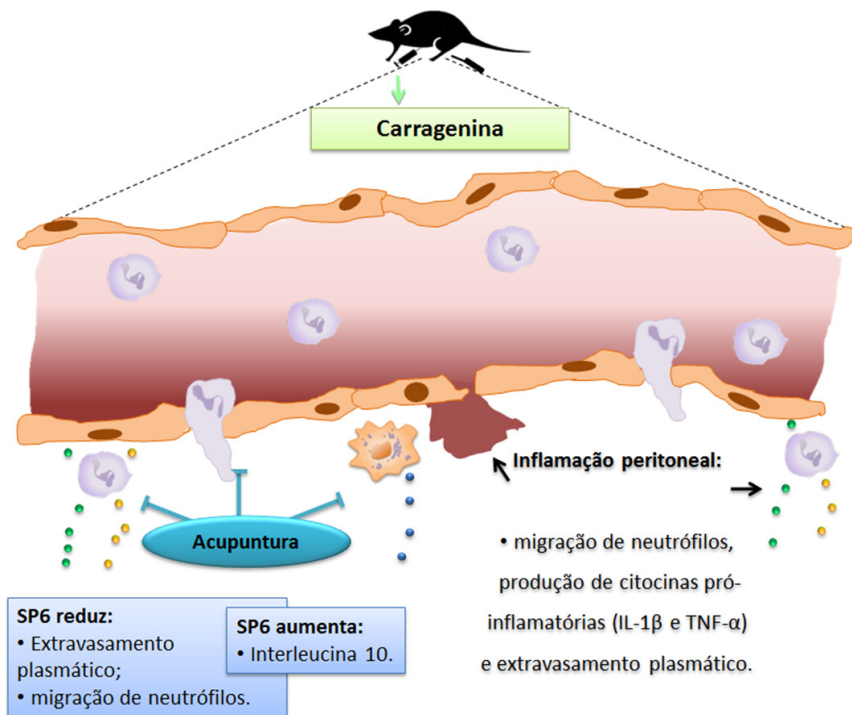


(a) Via difusa: através da circulação chegam células inflamatórias (monócitos e neutrófilos) e citocinas ao local da inflamação. Os produtos inflamatórios produzidos no tecido lesionado (TNF, IL-1, HMGB1) difundem para a corrente sanguínea, e produtos anti-inflamatórios (hormônios glicocorticóides, MSH, IL-10) difundem para o local. (b) Via neural: produtos inflamatórios a partir de macrófagos teciduais são liberados localmente. A acetilcolina (ACh) inibe a liberação de TNF por macrófagos, e adrenalina e a noradrenalina predominantemente inibem a liberação de TNF, mas podem, em algumas circunstâncias, estimular a liberação dele. A substância P pode estimular a síntese de citocinas para amplificar os locais de resposta inflamatória e pode também mediar a dor.

Fonte: Adaptado de Tracey (2002).

Essa teoria pode explicar em parte o efeito anti-inflamatório de acupuntura, reduzindo a migração celular e o edema causado pela peritonite induzida por carragenina. No entanto, no presente estudo, a acupuntura no SP6 não modificou os níveis de IL-1 β e TNF- α , mas aumentou os níveis de IL-10 no exsudato peritoneal. Estes dados em conjunto, demonstram que os efeitos anti-inflamatórios da acupuntura manual no acuponto SP6 depende das glândulas supra-renais e do aumento nos níveis de IL-10 (Figura 38). Estudos complementares são necessários para elucidar completamente os mecanismos subjacentes ao efeito anti-inflamatório da acupuntura no SP6.

Figura 38: Indução da peritonite pela carragenina e efeito da acupuntura no acuponto SP6 sobre este modelo inflamatório.



Fonte: Esquema adaptado de da Silva et al, 2011.

5.4 PARTE IV: ACUPONTO SP6 EXERCE EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO EM ANIMAIS SUBMETIDOS À INFLAMAÇÃO MUSCULAR INDUZIDA POR CARRAGENINA POR RESTABELECEM NÍVEIS DA CITOCINA IL-10

Uma vez que o efeito anti-inflamatório da acupuntura manual no acuponto SP6 parece depender, ao menos em parte, do aumento de citocinas anti-inflamatórias IL-10, procurou-se verificar o papel dessa citocina no efeito anti-inflamatório da acupuntura em um modelo de inflamação.

Neste trabalho, observou-se que o tratamento com acupuntura reduziu a dor muscular inflamatória muscular induzida por carragenina. As alterações locais que ocorrem após o insulto com carragenina são provavelmente responsáveis pela sensibilização dos nociceptores periféricos e aferentes primários, os quais contribuem para o desenvolvimento de hiperalgesia secundária, em conjunto com as alterações centrais (MENSE, 1993; SCHAIBLE; EBERSBERGER; VON BANCHET, 2002; RADHAKRISHNANA; MOOREC; SLUKA, 2003). A carragenina produz hiperalgesia cutânea por sensibilizar nociceptores diretamente ou por estimular a liberação de aminas simpáticas (CUNHA et al, 2005; LORAM et al, 2007), além de ciclooxigenase e outras substâncias na medula espinal - que podem ser responsáveis pela sensibilização central - seguido da inflamação muscular induzida por carragenina (SCHAIBLE et al, 1987; DOUGHERTY; WILLIS, 1992; HOHEISEL; SANDER; MENSE, 1995; RADHAKRISHNANA; MOOREC; SLUKA, 2003).

Neste trabalho, foi demonstrado que a acupuntura manual no acuponto SP6 reduziu a hipersensibilidade mecânica avaliada por filamentos de von Frey na pata (ou hiperalgesia secundária) e pelo teste de força de preensão da pata. Além disso, reduziu a hipersensibilidade térmica ao calor avaliada na pata pelo teste de Hargreaves, em camundongos. Foi verificado posteriormente que a acupuntura restabeleceu os níveis de citocinas anti-inflamatória IL-10 nos músculos lesionados. Admite-se que a acupuntura demonstra ações reconhecidas sobre muitas doenças e sintomas, como dor nas costas, dor de cabeça, reabilitação de acidente vascular encefálico, entre outras. O NIH recomendou esta técnica como um tratamento alternativo ou adjuvante para dor e/ou inflamação de uma variedade de condições como a

fibromialgia, dor miofascial e osteoartrite (NIH CONSENSUS CONFERENCE, 1998; KAVOUSSI; ROSS, 2007).

Posteriormente, na Universidade de Iowa, foi confirmado os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da acupuntura realizada no acuponto SP6 em camundongos de outra linhagem (C57BL/6). Pode-se observar que a acupuntura aumentou o limiar de dor (diminuiu a nocicepção) nos animais que receberam injeção de carragenina no músculo gastrocnêmio, testados no teste de hipersensibilidade mecânica usando filamentos de von Frey (hiperalgesia secundária) e também reduziu a hipersensibilidade mecânica no teste da pinça (hiperalgesia primária). Além disso, a estimulação da agulha no SP6 reduziu o edema muscular nos animais que receberam carragenina e foi capaz de aumentar o tempo que os animais se mantiveram no lado nocivo no teste de fuga/esquiva, o que sugere que o efeito da acupuntura parece envolver estruturas centrais. Vários autores mostram que estruturas supra espinais estão envolvidas na analgesia por acupuntura, e sabe-se que a dor é uma experiência subjetiva que tem múltiplas dimensões, incluindo componentes sensoriais, emocionais e cognitivos que envolvem maior nível de processamento central (LUO; WANG, 2008; ZHAO, 2008, CHO et al, 1998). Assim, o sucesso da estimulação por acupuntura em reduzir a dor, além de outros métodos analgésicos, provavelmente envolve várias dimensões, como esses componentes com maior processamento central (LUO; WANG, 2008).

Acredita-se que parte do mecanismo anti-inflamatório da acupuntura pode ser atribuído ao aumento da liberação de IL-10. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória com um papel crucial na prevenção de doenças inflamatórias e auto-imunes (MOORE et al, 2001). Esta citocina é secretada sob diferentes condições de ativação imune através de uma variedade de tipos de células, incluindo células T, células B, células dendríticas e monócitos/macrófagos. A IL-10 pode suprimir respostas inflamatórias e é conhecida por ser um fator importante na manutenção da homeostase das respostas imunes (SABAT, 2010; MOORE et al, 2001).

Para determinar de forma mais confiável a importância do efeito da citocina IL-10 no tratamento com acupuntura no acuponto SP6, fez-se uso de camundongos geneticamente modificados, nocautes para IL-10 (IL10-/-). Os animais IL10-/- que foram tratados com acupuntura manual no acuponto SP6 não responderam como os animais Swiss ou C57BL/6. Ou seja, neste caso, não se observou nenhum efeito antinociceptivo ou anti-inflamatório da acupuntura no ponto SP6.

A IL-10 desempenha um papel importante na regulação do recrutamento de neutrófilos em diversos modelos de inflamação. Além disso, existe uma relação direta entre a produção de IL-10 e a nocicepção, pois ela pode afetar a nocicepção através da regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias (VALE et al, 2003; LAUGHLIN et al, 2000). O pré-tratamento com IL-4, IL-10 e IL-13 bloqueia a hiperalgesia induzida por carragenina, bradicinina e TNF- α na pata (RITTNER; MACHELSKA; STEIN, 2005). As ações analgésicas da IL-10 não são vistas apenas na inflamação da pata, mas também em modelos de inflamação como peritonite e inflamação na pata e joelho (CUNHA; FERREIRA, 2003). No entanto, o papel da IL-10 endógena na percepção da dor ainda não está bem esclarecido (VALE et al, 2003). A expressão de IL-10 na população de macrófagos pode ser especialmente significativa na regeneração muscular. A administração exógena de IL-10 em células musculares, em cultura celular, aumentou a proporção de células que apresentam miogenina, ou seja, os autores afirmam que um aumento da miogenia foi causado pela IL-10 (TIDBALL; VILLALTA, 2010). A proposta é que a IL-10 atua por algum tipo de célula intermediária que induz a liberação de fatores que afetam a diferenciação muscular. Os próprios macrófagos poderiam servir como esta célula intermediária, uma vez que a IL-10 pode afetar a produção de TNF- α e IFN- γ por células mielóides e estas citocinas podem afetar a diferenciação muscular. A transcrição de resposta do tipo Th1 para uma resposta Th2, envolvendo macrófagos M2, forneceria uma população de células mielóides que pode promover a diferenciação muscular que caracteriza posteriores etapas de resposta inflamatória (TIDBALL; VILLALTA, 2010).

A secreção de IL-10 é regulada por promotores de IL-10 porque diversos fatores de transcrição respondem a elementos diferenciados (PLATZER et al, 1995; ASADULLAH; STERRY; VOLK, 2003). Assim, os macrófagos e outras fontes de IL-10 são estimulados a produzir IL-10 por vários fatores endógenos e exógenos: endotoxinas, TNF- α , catecolaminas e drogas que elevam o AMP cíclico (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) (PLATZER et al, 1995; 1999; 2000; MEISEL et al, 1996; WOICHIECHOWSKY et al, 1998; RIESE et al, 2000; ASADULLAH; STERRY; VOLK, 2003). A inflamação do sistema nervoso central ou a ativação indireta do eixo HPA por endotoxemia/bacteremia desencadeia a liberação de catecolaminas que podem regular a produção de IL-10 por macrófagos, especialmente no fígado (BARSIG et al, 1995; JILG et al, 1996; WOICHIECHOWSKY et al, 1998). Precursores de macrófagos são liberados na circulação como

monócitos (GEISSMANN et al, 2010; MURRAY; WYNN, 2011), e quando ultrapassam o endotélio, se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas. Os monócitos, os macrófagos, as células dendríticas, juntamente com neutrófilos e mastócitos, detectam os sinais liberados em tecidos lesionados (MANTOVANI, RABINOVITCH; NUSSENZWEIG, 1972; MURRAY; WYNN, 2011). É importante que haja inibição do recrutamento de neutrófilos e promoção do recrutamento de monócitos, pois o sucesso da resolução da inflamação aguda resulta da resposta na eliminação dos agentes infecciosos, seguido por uma fase de resolução e de reparação, que é mediada principalmente por macrófagos residentes e recrutados (SERHAN; SAVILL, 2005; MEDZHITOV, 2008). Macrófagos maduros estão estrategicamente localizados em todo o corpo e realizam uma importante função de vigilância imunológica. Quando um macrófago fagocita um patógeno, captura-o em um fagossoma. Macrófagos teciduais suprimem a inflamação garantindo assim que a homeostase dos tecidos seja restaurada após o término da infecção ou lesão (MURRAY; WYNN, 2011).

Neste modelo de lesão do músculo e em vários outros, os macrófagos são necessários para a resolução da inflamação e restabelecimento da integridade do tecido, removendo detritos e promovendo a proliferação e diferenciação das células parenquimatosas. A troca de macrófagos do tipo M1 para M2, durante a progressão da resposta inflamatória, permite que o duplo papel dos macrófagos na orquestração do processo inflamatório ocorra e, subsequentemente, promoção da cicatrização e reparação tecidual (RADHAKRISHNANA; MOOREC; SLUKA, 2003; MURRAY; WYNN, 2011). Neste estudo foi contado o total de macrófagos presentes no gastrocnêmio de camundongos que receberam carragenina. A quantidade total de macrófagos aumentou nos músculos lesionados dos animais controle, em comparação com os animais sem lesões. Observou-se que os animais que receberam acupuntura tiveram a quantidade de macrófagos semelhante aos animais do grupo controle, isto é, a acupuntura manual no SP6 não foi capaz de reduzir a quantidade de macrófagos no local da lesão. Por isso, decidiu-se investigar se havia diferença fenotípica nos macrófagos estudados.

Após lesão ou infecção do tecido, os macrófagos ditos clássicos ou socorristas, geralmente, exibem um fenótipo inflamatório e secretam mediadores pró-inflamatórios tais como o TNF- α , óxido nítrico e IL-1 β , que participam da ativação de vários mecanismos antimicrobianos,

incluindo processos oxidativos que contribuem para a morte de organismos invasores (SERBINA et al, 2003; BOSSCHAERTS et al, 2010). De acordo com o microambiente, os macrófagos podem adquirir fenótipos funcionais distintos, que são os macrófagos clássicos (M1) e os macrófagos alternativos (M2) (LAWRENCE; NATOLI, 2011). Macrófagos M2 tem uma função anti-inflamatória e regulam a cicatrização de feridas, podendo secretar grandes quantidades de IL-10 (SUTTERWALA et al, 1997; SUTTERWALA et al, 1998). Quando foi contado o diferencial de macrófagos, observou-se que os animais tratados com acupuntura apresentaram uma redução na quantidade de macrófagos do tipo M1 e aumento de macrófagos M2 no músculo, comparado com os animais do grupo controle.

A diferenciação dos macrófagos depende do microambiente tecidual, como a presença de citocinas, fatores de crescimento e microorganismos, e estes sinais são responsáveis por moldar o fenótipo e a função dos macrófagos (MURRAY; WYNN, 2011). Há muita evidência de que as subpopulações distintas de macrófagos podem surgir em circunstâncias diferentes, ou em resposta a diferentes estímulos (PORCHERAY et al, 2005; LUMENG et al, 2007). Citocinas Th2, como a própria IL-10, podem induzir a diferenciação em macrófagos do tipo M2 que geram mediadores anti-inflamatórios tais como a IL-10 (MANTOVANI et al, 2004; GORDON, 2007; YAKEU et al, 2010). Neste estudo, é possível sugerir que a acupuntura está associada com a produção de citocinas Th2, em particular a IL-10. A ativação de outras moléculas tais como PPAR γ (Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama) poderiam ser responsáveis pela redução de macrófagos M1 e aumento de M2 que ocorreu nos animais tratados com acupuntura. Alguns autores mostraram que as citocinas Th2, como a IL-4, tem seus efeitos induzidos por meio de ligantes de PPAR γ e esta é a explicação para a expressão aumentada de M2 e expressão reduzida de M1 induzidas por exercício físico (YAKEU et al, 2010). Acredita-se que o papel parácrino de citocinas Th2 em promover a diferenciação de monócitos circulantes em macrófagos M2 é induzido pelo tratamento com acupuntura, talvez pelo aumento direto de IL-10 pelos macrófagos, como um circuito fechado de retroalimentação.

Villalta e colaboradores (2011) demonstraram que a IL-10 reduz alterações encontradas na distrofia muscular, em animais modificados geneticamente para o gene da distrofina, simulando a distrofia muscular de Duchenne (distrofia muscular *mdx*). Isto acontece por desativação de macrófagos M1 e mudança do seu fenótipo (VILLALTA et al, 2011). O

camundongo *mdx* apresenta fases de degeneração do músculo esquelético e marcada regeneração subsequente; à medida que envelhecem, alguns músculos, como o diafragma, apresentam fraqueza e aumento da fibrose. Usando os animais *mdx* ou suas células, os autores demonstraram que a IL-10 pode reduzir a citotoxicidade causada por macrófagos M1. A IL-10 ainda promove mudança no fenótipo do macrófago para M2, *in vivo* e *in vitro*, além de promover fagocitose pelos macrófagos musculares. A citocina IL-10 desativa o fenótipo M1 e especificamente inibe a expressão de iNOS (óxido nítrico sintase) e consequentemente reduz o dano muscular pela redução na quantidade de NO (óxido nítrico) (VILLALTA et al, 2009). Pesquisas anteriores demonstraram que a fagocitose através de macrófagos M1 pode induzir o fenótipo M2 *in vitro* e, eventualmente, no músculo lesionado *in vivo* (ARNOLD et al, 2007), ou seja, macrófagos fagocíticos M1 seriam eliminados do montante M1 e modificariam o fenótipo para M2. Portanto, o próprio aumento da citocina IL-10, induzido pela acupuntura manual no SP6, pode estar modificando o fenótipo dos macrófagos presentes no músculo, porém sem alterar a quantidade total desses macrófagos presentes no local da lesão.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível observar os seguintes resultados:

- A acupuntura manual realizada no acuponto SP6 demonstrou efeito antinociceptivo em modelos de dor aguda; o melhor efeito antinociceptivo do acuponto SP6 foi observado com 10 minutos de retenção da agulha, analisado 15 minutos depois da retirada da mesma, e o efeito antinociceptivo do SP6 foi observado apenas quando a acupuntura foi realizada ipilateralmente à lesão;

- A ativação de fibras nervosas periféricas aferentes mielinizadas e não mielinizadas (do tipo C) têm papel crucial na antinocicepção causada pelo acuponto SP6;

- O tratamento com acupuntura manual no acuponto SP6 aumentou, em todos os dias de tratamentos, o limiar de retirada da pata no teste do von Frey (hipersensibilidade mecânica) e no teste do Hargreaves (hipersensibilidade térmica ao calor); não modificou o limiar de retirada da pata na Placa fria (hipersensibilidade térmica ao frio);

- A acupuntura manual no acuponto SP6 teve um efeito antinociceptivo pronunciado comparado a outros acupontos usados (ST35, BL57, KI3, GB39 e LR5), mostrando que a escolha dos acupontos tem um papel importante no tratamento com acupuntura manual;

- O tratamento com o SP6 aumentou a expressão de proteína c-Fos em diferentes áreas centrais: LC, PAG, Rafe, PVN, amígdala central e hipocampo (áreas CA1, CA2, CA3, CA4 e GD) e os receptores kapa opióides, dopaminérgicos, colinérgicos e adenosinérgicos (A1) são importantes no efeito antinociceptivo da acupuntura realizada no SP6;

- A acupuntura manual no SP6 apresentou efeito anti-inflamatório no modelo de peritonite induzida por carragenina, que depende em parte dos glicocorticóides endógenos e aumento dos níveis de citocina anti-inflamatória IL-10;

- O tratamento com acupuntura no SP6 reduziu a nocicepção bem como a inflamação no modelo de dor muscular induzido por carragenina; reduziu a hipersensibilidade mecânica e térmica ao calor no modelo de dor muscular; e restabeleceu os níveis de IL-10 no músculo dos animais tratamento com acupuntura no SP6;

- A acupuntura no SP6 reduziu a hipersensibilidade mecânica dos animais C57BL/6 no teste de von Frey e no teste da pinça; e reduziu o edema muscular em animais C57BL/6 e aumentou o tempo em que os

animais C57BL/6 se mantiveram no lado nocivo no teste de Fuga x Esquiva, o que sugere que a acupuntura pode envolver estruturas centrais;

- Animais nocaute para IL-10 (IL-10^{-/-}) não respondem ao tratamento com o acuponto SP6;

- Os camundongos tratados com acupuntura no SP6 apresentaram uma redução na quantidade de macrófagos do tipo M1 e aumento de M2 (macrófago anti-inflamatório e importante fonte de IL-10) no músculo.

Em suma, os dados apresentados neste estudo estendem os resultados descritos na literatura e claramente demonstram que a acupuntura manual realizada no acuponto SP6 produz considerável efeito antinociceptivo e anti-inflamatório em modelos de dor aguda e crônica (neuropática e inflamatória). Além disso, foram obtidos avanços significativos em relação aos mecanismos neurobiológicos que são ativados pela acupuntura no acuponto SP6, sendo que este é o primeiro relato que mostra o importante papel da liberação da citocina anti-inflamatória IL-10 no efeito da acupuntura.

REFERÊNCIAS

AI, M. K., RU, L. Q. AND LUO, Q. Y. Influence of electroacupuncture on the cholinesterase activity in thalamus of rat. **Proc Nat Symp Acupuncture, Moxibustion and Acupuncture Anaesthesia**, p. 445, 1979.

AHN, A. C.; COLBERT, A. P.; ANDERSON, B. J.; et al. Electrical Properties of Acupuncture Points and Meridians: A Systematic Review. **Bioelectromagnetics**, v. 29, p. 245-256, 2008.

ALBAZAZ, R.; WONG Y.T.; HOMER-VANNIASINKAM S. Complex regional pain syndrome: a review. **Annals of vascular surgery**, v. 22, p. 297-306, 2008.

ANDERSSON, S. A.; ERICSON, T.; HOLMGREN, E.; LINDQVIST, G. Electro-acupuncture and pain threshold. **Lancet**, v. 8, p. 564, 1973. (a)

ANDERSSON, S. A.; ERICSON, T.; HOLMGREN, E.; LINDQVIST, G. Electro-acupuncture. Effect on pain threshold measured with electrical stimulation of teeth. **Brain Res**, v. 7, p. 393-396, 1973. (b)

ARNOLD, L.; HENRY, A.; PORON, F.; et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into anti-inflammatory macrophages to support myogenesis. **J Exp Med**, v. 204, p. 1057-1069, 2007.

ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 Therapy – Review of a new approach. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 241-269, 2003.

ASSEFI, N. P.; SHERMAN, K. J.; JACOBSEN, C.; et al. A randomized clinical trial of acupuncture compared with sham acupuncture in fibromyalgia. **Ann Intern Med**, v. 143, p. 10-19, 2005.

ATTAL, N.; CRUCCU, G.; BARON, R.; et al. EFNS guidelines on the pharmacological treatment neuropathic pain: 2010 revision. **Eur J Neurol**, v. 17, p. 1113-1188, 2010

BAO, H.; ZHOU, Z.; YU, Y.; HAN, J. C fiber is not necessary in electroacupuncture analgesia, but necessary in diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). **Zhen Ci Yan Jiu**, v. 16, p. 120-124, 1991.

BARON, R. Mechanisms of disease: neuropathic pain – a clinical perspective. **Nat Clin Prat Neurol**, v. 2, p. 95-106, 2006.

BARON, R. Neuropathic pain: a clinical perspective. **Handb Exp Pharmacol**, v. 194, p. 3-30, 2009

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39-50, 2012.

BARSIG, J.; KUSTERS, S.; VOGT, K.; et al. Lipopolysaccharide-induce IL-10 in mice: role of endogenous TNF-alpha. **Eur J Immunol**, v. 25, p. 2888-2893, 1995.

BASBAUM, A. L.; JESSEL, T. The perception of pain. In **Principles of Neuroscience**, E. R. Kandel, J. Schroartz , and T. Jessel, eds. (New York: Applleton and Lange), p. 472-491, 2000.

BASBAUM, A. L.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284, 2009.

BASBAUM, A. I.; BUSHNELL, C. **Science of pain**. Oxford, U.K: Elsevier, 2009.

BEEKHUIZEN, H.; VAN FURTH, R. Monocyte adherence to human vascular endothelium. **J Leukoc Biol**, v. 54, p. 363-378, 1993.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, p. 87-107, 1988.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.

BESSOU, P.; PERL, E. R. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. **J Neurophysiol**, v. 32, p. 1025-1043, 1969.

BING, Z.; VILLANUEVA, L.; LE BARS, D. Acupuncture and diffuse noxious inhibitory controls: naloxone- reversible depression of activities of trigeminal convergent neurons. **Neuroscience**, v. 37, p. 809-818, 1990.

BINSHTOK, A. M.; GERNER, P.; OH, S.B.; et al. Co-application of Lidocaine and the Permanently Charged Sodium Channel Blocker QX-314 Produces a Long-lasting Nociceptive Blockade in Rodents. **Anesthesiology**, v. 111, p. 127-137, 2009.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunol**, v. 11, p. 889-896, 2010.

BONAFEDE, M.; DICK, A.; NOYES, K.; et al. The effect of acupuncture utilization on healthcare utilization. **Med Care**, v. 46, p. 41-48, 2008.

BO, C.; XUE, Z.; YI, G.; et al. Assessing the quality of reports about randomized controlled trials of acupuncture treatment on Diabetic Peripheral Neuropathy. **PLoS One**, v. 7, p. e38461, 2012.

BOSSCHAERTS, T.; GUILLIAMS, M.; STIJLEMANS, B.; et al. Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN-gamma and MyD88 signaling. **PLoS Pathog**, v. 6, p. 1-12, 2010.

BOUCHER, T. J.; OKUSE, K.; BENNETT, D. L.; et al. Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states. **Science**, v. 290, p. 124-127, 2000.

BOUHASSIRA, D.; LANTÉRI-MINET, M.; ATTAL, N.; et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. **Pain**, v. 136, p. 380-387, 2008

BOVEY, M.; HORNER, C.; SHAW, J.; et al. Engaging in the audit of acupuncture practice. **J Altern Complement Med**, v. 11, p. 293-298, 2005.

BOWEN, C. A.; NEGUS, S. S.; ZONG, R.; et al. Effects of mixed-action kappa/mu opioids on cocaine self-administration and cocaine discrimination by rhesus monkeys. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, p. 1125-1139, 2003.

BRUNEAU, E. G.; AKAABOUNE, M. Running to stand still: ionotropic receptor dynamics at central and peripheral synapses. **Mol Neurobiol**, v. 34, p. 137-151, 2006.

CABIOĞLU, M. T.; CETIN, B. E. Acupuncture and immunomodulation. **Am J Chin Med**, v. 36, p. 25-36, 2008.

CALVINO, B.; GRILO, R. M. Central pain control. **Joint Bone Spine**, v. 73, p. 10-16, 2006.

CAO, X.D. Scientific bases of acupuncture analgesia. **Acupunct Electrotherap Res Int J**, v. 27, p. 1-14, 2002.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 23; p. 816-824, 1997.

CHA, M. H.; CHOI, J. S.; BAI, S. J.; et al. Antiallodynic effects of acupuncture in neuropathic rats. **Yonsei Med J**, v. 47, p. 359-366, 2006.

CHA, M. H.; BAI, S. J.; LEE, K. H.; et al. Acute electroacupuncture inhibits nitric oxide synthase expression in the spinal cord of neuropathic rats. **Neurol Res**, v. 32, Suppl 1, p. 96-100, 2010.

CHAN, E. L.; AHMED, T. M.; WANG, M.; CHAN, JC. History of medicine and nephrology in Asia. **Am J Nephrol**, v.14, p.295-301, 1994.

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; et al.
Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, 1994.

CHENG, R. S. S.; POMERANZ, B. H. Electroacupuncture analgesia is mediated by stereospecific opiate receptors and is reversed by antagonists of type 1 receptors. **Life Sci**, v. 26, p. 631-638, 1980.

CHENG, R. S.; POMERANZ, B. Monoaminergic mechanism of electroacupuncture analgesia. **Brain Res**, v. 29, p. 77-92, 1981.

CHENG, C. H.; YI, P. L.; LIN, J. G.; CHANG, F. C. Endogenous opiates in the nucleus tractus solitarius mediate electroacupuncture-induced sleep activities in rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, Epub 2011 Feb 13, 2012.

CHERKIN, D. C.; SHERMAN, K. J.; ALVINS, A. L.; et al. A randomized trial comparing acupuncture, simulated acupuncture, and usual care for chronic low back pain. **Arch Intern Med**, v. 169, p. 858-866, 2009.

CHIANG, C. Y.; CHANG, C.T.; CHU, H. L.; et al. Peripheral afferent pathway for acupuncture analgesia. **Scientia Sinica**, v. 16, p. 210-217, 1973.

CHMIEL, J. F.; KONSTAN, M. W.; SAADANE, A.; et al. Prolonged inflammatory response to acute *Pseudomonas* challenge in interleukin-10 knockout mice. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 15, p. 1176-1181, 2002.

CHO, Z. H.; HWANG, S. C.; WONG, E. K.; et al. Neural substrates, experimental evidences and functional hypothesis of acupuncture mechanisms. **Acta Neurol Scand**, v. 113, p. 370-377, 2006.

CHUDLER, E. H.; DONG, W. K. The role of the basal ganglia in nociception and pain. **Pain**, v. 60, p. 3-38, 1995.

CHUNG, W. Y.; ZHANG, H. Q.; ZHANG, S. P. Peripheral muscarinic receptors mediate the anti-inflammatory effects of auricular acupuncture. **Chin Med**, v. 21, p. 6-13, 2011.

CIDRAL-FILHO, F. J.; da SILVA, M. D.; MOREÍ, A. O.; et al. Manual acupuncture inhibits mechanical hypersensitivity induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuroscience**, v. 13, p. 370-376, 2011.

CLARK, F. M.; PROUDFIT, H. K. The projection of locus coeruleus neurons to the spinal cord in the rat determined by anterograde tracing combined with immunocytochemistry. **Brain Res**, v. 11, p. 231-245, 1991.

CODERRE, T. J.; VACCARINO, A. L.; MELZACK, R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. **Brain Res**, v. 535, p. 155-158, 1990.

CODERRE, T. J.; KATZ, J.; VACCARINO, A. L.; et al. Contribution of central neruplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, v. 52, p. 259-285, 1993.

COSTIGAN, M.; BEFORT, K.; KARCHEROSKI, L; et al. Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root gânglio after perioplural nerve injury. **BMC Neurosci**, v. 3, p. 16-33, 2002

CREFITO 10. CONSELHO REGIONAL DE FISIOTERAPIA E TERAPIA OCUPACIONAL 10ª REGIÃO - RIO GRANDE DO SUL. LEGISLAÇÃO. **Leis e Atos Normativos das Profissões de Fisioterapia e de Terapia Ocupacional**. Disponível em: <http://www.crefito10.org.br/legislacao-crefito10-v1.2/#!/8/>. Acesso em: 21 jan. 2013.

CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Peripheral hyperalgesic cytokines. **Adv Exp Med Biol**, v. 521, p. 22-39, 2003.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. JR.; SILVA, J. S.; et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci**, v. 102, p. 1755-1760, 2005.

CZURA, C. J.; TRACEY, K. J. Autonomic neural regulation of immunity. **J Intern Med**, v. 257, p. 156-166, 2005.

DAI, Y.; KONDO, E.; FUKUOKA, T.; et al. The effect of electroacupuncture on pain behaviors and noxious stimulus-evoked Fos expression in a rat model of neuropathic pain. **J Pain**, v. 2, p. 151-159, 2001.

DALE, H. H. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 6, p. 147-190, 1914.

da SILVA, M. D.; GUGINSKI, G.; WERNER, M. F.; et al. Involvement of Interleukin-10 in the Anti-Inflammatory Effect of Sanyinjiao (SP6) Acupuncture in a Mouse Model of Peritonitis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

DAVIES, S. N.; LODGE, D. Evidence for involvement N-methylaspartate receptors in “wind-up” of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. **Brain Res**, v. 424, p. 402-406, 1987.

DEADMAN, P.; BAKER, K.; AL-KHAFI, M. A Manual of Acupuncture. Vista, CA, USA: Eastland Press, 1998.

de CASTRO FRANÇA, S.; CORREA, M. M.; DOS SANTOS SCHIVO, I. R.; et al. A low molecular weight proinflammatory factor from rat spleen lymphocytes. Isolation and partial characterization. **Inflammation**, v. 30, p. 87-96, 2007.

DECOSTERD, I.; BERTA, T. Animal Models and Neuropathic Pain. In: BASBAUM, A. I. (org.); BUSHNELL, M.C. (org.). **Science of pain**, Oxford, UK: Elsevier Inc., p. 857-864, 2009.

DICKENSON, A. H.; SULLIVAN, A. F. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. **Neurosci Lett**, v. 83, p. 207-211, 1987.

DINKEL, K.; MACPHERSON, A.; SAPOLSKY, R. M. Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS. **J Neurochem**, v. 84, p. 705-716, 2003.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 20, p. 441-462, 1980.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **Br J Anaesth**, Epub 2008 Apr 15.

DOBKIN, P. L.; BOOTHROYD, L. J. Organizing health services for patients with chronic pain: when there is a will there is a way. **Pain Med**, v. 9, p. 881-889, 2008.

DONALD, G. K.; TOBIN, I.; STRINGER, J. Evaluation of acupuncture in the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Acupunct Med**, v. 29, p. 230-233, 2012.

DOUGHERTY, P. M.; WILLIS, W. D. Enhanced responses of spinothalamic tract neurons to excitatory amino acids accompany capsaicin-induced sensitization in the monkey. **J Neurosci**, v. 12, p. 883-894, 1992.

DOWNEY, G. P.; FIALKOW, L.; FUKUSHIMA, T. Initial interaction of leukocytes within the microvasculature: deformability, adhesion, and transmigration. **New Horiz**, v. 3, p. 219-228, 1995.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G.; The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161-174, 1977

DWORKIN, R. H.; BACKONJA, M.; ROWBOTHAM, M. C.; et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Arch Neurol**, v. 60, p. 1524-1534, 2003.

EGOZI, E. I.; FERREIRA, A. M.; BURNS, A. L.; et al. Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 11, p. 46-54, 2003.

ELLIOTSON, J. On the Use of the Sulphate of Copper in Chronic Diarrhœa. To which are added some Observations on the Use of

Acupuncture in Rheumatism. **Med Chir Trans**, v. 13, p. 451-468, 1827.

ERNEST, E.; MYEONG, S.L.; TAE-YOUNG, C. Acupuncture: Does it alleviate pain and are there serious risks? A review of reviews. **Pain**, v. 152, p. 755-764, 2011.

FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, W. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. **Anesthesiology**, v. 98:729-733, 2003.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M. II - Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonists. **Prostaglandins**, v. 18, p. 191-200, 1979.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I. Brainstem control of spinal pain-transmission neurons. **Annu Rev Physiol**, v. 40, p. 217-248, 1978.

FILSHIE, J.; ZARNEGAR, R. Acupuncture. In: HOLDCROFT, Anita; JAGGAR, Siân. **Core topics in Pain**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 247-254, 2005.

FINNERUP, N. B.; JENSEN, T. S. Spinal cord injury pain – mechanisms and treatment. **Eur J Neurol**, v. 11, p. 73-82, 2004.

FINNERUP, N. B.; OTTO, M.; MCQUAY, H. J.; et al. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. **Pain**, v. 118, p. 289-305, 2005.

FOLEY, K. M.; INTURRISI, C. E. Analgesic drug therapy in cancer pain: principles and practice. **Med Clin North Am**, v. 71, p. 207-232, 1987.

FOSTER, J. M. G.; SWEENEY, B. P. The mechanisms of acupuncture analgesia. **Br J Hosp Med**, v. 38, p. 308-312, 1987.

FRÖDE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflamm**, v. 10, p. 223-227, 2001.

FRÓIO, L. R. **A expansão da Medicina Tradicional Chinesa: uma análise da vertente cultural das Relações Internacionais.** 2006. 120f. Dissertação (Mestrado em Relações Internacionais) - Universidade de Brasília – UNB - Instituto de Relações Internacionais – IREL, Brasília, DF. Disponível em <http://repositorio.bce.unb.br/bitstream/10482/1837/1/liliana%20ramalho%20froio.pdf>. Acesso em 22 jan 2013.

GAO, Y. J.; JI, R. R. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? **Open Pain J**, v. 2, p. 11-17, 2009.

GE, Z.; HUANG, W. M. A comparison between the influence of acupuncture and morphine upon locus coeruleus and raphe nucleus. **Proc Natn Syrup Acupuncture, Moxibustion and Acupuncture Anaesthesia**, p. 431, 1979.

GEBHART, G. F.; SANDKUHLER, J.; THALHAMMER, J. G.; ZIMMERMANN, M. Inhibition of spinal nociceptive information by stimulation in midbrain of the cat is blocked by lidocaine microinjected in nucleus raphe magnus and medullary reticular formation. **J Neurophysiol**, v. 50, p. 1446–1459, 1983.

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S.; et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 5, p. 656-661, 2010.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, p. 401-416, 2004.

GOLDMAN, N.; CHEN, M.; FUJITA, T.; et al. Adenosine A1 receptors mediate local antinociceptive effects of acupuncture. **Nat Neurosci**, v. 13, p. 883-888, 2010.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 9a. ed. Rio Janeiro, Guanabara Koogan, p. 1436, 1996.

GORDON, S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. **J Clin Invest**, v. 117, p. 89-93, 2007.

GREENBERG, M.E.; ZIFF, E.B.; GREENE, L.A. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. **Science**, v. 234, p. 80-83, 1986.

GREER, K. R.; HOYT, J. W. Pain: theory, anatomy, and physiology. **Crit Care Clin**, v. 6, p. 227-234, 1990.

GUAN, X. M.; Yu, Z. The role of cholinergic nerves in electroacupuncture analgesia: influence of eserine, acetylcholine and hemicholinium-3 on electroacupuncture analgesia. **Proc Natn Symp Acupuncture, Moxibustion and Acupuncture Anaesthesia**, p. 443, 1979.

GUO, R.; ZHANG, L.; GONG, Y.; ZHANG, B. The treatment of pain in bone metastasis of cancer with the analgesic decoction of cancer and the acupoint therapeutic apparatus. **J Tradit Chin Med**, v. 15, p. 262-264, 1995.

HAKER, E.; LUNDEBERG, T. Acupuncture treatment in epicondylalgia: a comparative study of two acupuncture techniques. **Clin J Pain**, v. 6, p. 221-226, 1990.

HAN, J. S. The role of some central neurotransmitters in acupuncture analgesia. **Proc Natn Symp Acupuncture, Moxibustion and Acupuncture Anaesthesia**, p. 27, 1979.

HAN, J. S.; DING, X. Z.; FAN, S. G. Cholecystokinin octapeptide (CCK-8): Antagonism to electroacupuncture analgesia and a possible role in electroacupuncture tolerance. **Pain**, v. 27, p. 101-115, 1986.

HAN, C.C. Acupuncture points histological properties, in **Acupuncture: The Past and The Present**, K. C. Huang, Ed., chapter 4, p. 47, Vantage Press, New York, NY, USA, 1996.

HAN, J.S. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. **Trends Neurosci**, v. 26, p. 17-22, 2003.

HAN, J.S. Acupuncture and endorphins. **Neurosci Lett**, v. 361, p. 258-261, 2004.

HAN, J. S. Acupuncture analgesia: Areas of consensus and controversy. **Pain**, v. 152, p. 1439-1441, 2011.

HARGREAVES, K. M.; DUBNER, R.; BROWN, F.; et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, p. 77-88, 1988.

HAWRYLOWICZ, C. M.; O'GARRA, A. Potential role of interleukin-10 secreting regulatory T cells in allergy and asthma. **Nature Rev Immunol**, v. 5, p. 271-286, 2005.

HE, L. F.; Xu, S. F.; JIANG, C. C. The role of the caudate nucleus in acupuncture analgesia. **Proc Natn Symp Acupuncture, Moxibustion and Acupuncture Anaesthesia**, p. 32, 1979.

HERRERO, J. F.; LAIRD, J. M. A.; LOPES-GARCIA, J. A. Wind-up of spinal cord neurons and pain sensation: much ado about something? **Prog Neurobiol**, v. 61, p. 169-203, 2000.

HIRSH, A. T.; ATCHISON, J. W.; BERGER, J. J.; et al. Patient Satisfaction With Treatment for Chronic Pain. **Clin J Pain**, v. 21, p. 302-310, 2005.

HOHEISEL, U.; SANDER, B.; MENSE, S. Blockade of nitric oxide synthase differentially influences background activity and electrical excitability in rat dorsal horn neurones. **Neurosci Lett**, v. 188, p. 143-146, 1995.

HOLZER, P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. **Adv Exp Med Biol**, v. 298, p. 3-16. 1991.

HONGWEI, Z.; ZHAOXIANG, B.; ZHIXIU, L. Are acupoints specific for diseases? A systematic review of the randomized controlled trials with sham acupuncture controls. **Chinese Medicine**, v. 5, p.1-7, 2010.

HUANG, C.; WANG, Y.; HAN, J. S.; WAN, Y. Characteristics of electroacupuncture-induced analgesia in mice: variation with strain,

frequency, intensity and opioid involvement. **Brain Res**, v. 26, p. 20-25, 2002.

HUANG, G. Y.; ZHENG, C. H.; YU, W. C.; et al. Involvement of connexin 43 in acupuncture analgesia. **Chin Med J**, v. 5, p. 54-60, 2009.

HWANG, H. S.; YANG, E. J.; LEE, S. M.; et al. Antiallodynic Effects of Electroacupuncture Combined with MK-801 Treatment through the Regulation of p35/p25 in Experimental Diabetic Neuropathy. **Exp Neurobiol**, v. 20, p. 144-152, 2011.

HUI, K. K.; LIU, J.; MARINA, O.; et al. The integrated response of the human cerebro-cerebellar and limbic systems to acupuncture stimulation at ST 36 as evidenced by fMRI. **Neuroimage**, v. 27, p. 479-496, 2005.

HUI, K. K.; MARINA, O.; LIU, J.; et al. Acupuncture, the limbic system, and the anticorrelated networks of the brain. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 157, p. 81-90, 2010.

HUNSKAAR, H. S.; FASMER, O. B.; HOKE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J Neurosci Methods**, v. 14, p. 69-76, 1985

HUNT, S. P.; PINI, A.; EVAN, G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. **Nature**, v. 328, p. 632-634, 1987.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat Rev Neurosc**, v. 2, p. 83-91, 2001.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci**, v. 69, p. 2911-2919. 2001.

INOWE, K.; TSUDA, M. Microglia e Neuropathic pain. **Glia**, v. 57, p. 1469-1479, 2009.

IRVING, G. A. Contemporary assessment and management of neuropathic pain. **Neurology**, v. 64, p. 21-27, 2005.

JACKSON, K.C. 2nd. Pharmacotherapy for neuropathic pain. **Pain practice**, v. 6, p. 27-33, 2006.

JI, R. R.; WOOLF, C. J. Neuronal plasticity and signal transduction on nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiol Dis**, v. 8, p. 1-10, 2001.

JI, R. R.; STRICHARTZ, G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. **Science**, v.252, p. 1-19, 2004.

JILG, S.; BARSIG J.; LEIST, M.; et al. Enhanced release of interleukin-10 and soluble tumor necrosis factor receptors as novel principles of methylxanthine action in murine models of endotoxic shock. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 278, p. 421-431, 1996.

JONES, P. G; DUNLOP, J. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. **Neuropharmacology**, v. 53, p. 197-206, 2007.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. L. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

KAGITANI, F.; UCHIDA, S.; HOTTA, H. Afferent nerve fibers and acupuncture. **Auton Neurosci**, v. 28, p. 2-8, 2010.

KALISCH, P. A. An overview of research on the history of leprosy. Part 1. From Celsus to Simpson, Circa. 1 A.D. Part 2. From Virchow to Møller-Christense, 1845-1973. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 43, p. 129-144, 1975.

KAVOUSSI, B.; ROSS, B.E. The neuroimmune basis of anti-inflammatory acupuncture. **Integr Cancer Ther**, v. 6, p. 251-257, 2007.

KEHL, L. J.; TREMPPE, T. M.; HARGREAVES, K. M. A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hyperalgesia. **Pain**, v. 85, p. 333-343, 2000.

KELLY, D. J.; AHMAD, M.; BRULL, S. J. Preemptive analgesia: physiological and pharmacological modalities. **Can J. Anaesth**, v. 48, p. 1000-1010, 2001.

KELLY, M.; HWANG, J. M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 120, p. 3-10, 2007.

KIEFFER, B. L.; EVANS, C. J. Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo. **Neuropharmacology**, v. 56; p. 205-212; 2009.

KIM, J. H.; GWAK, Y. S.; LEE, I.; et al. Antinociceptive Effects of Heterotopic Electroacupuncture in Formalin-Induced Pain. **Am J Chin Med**, v. 34, p. 565-574, 2006.

KIM, H.; SHIM, I.; YI, S. H.; et al. Warm needle acupuncture at Pungsi (GB31) has an enhanced analgesic effect on formalin-induced pain in rats. **Brain Res Bull**, v. 16, p. 164-169, 2009.

KLUSAKOVA, I.; DUBOVRY, P. Experimental models of peripheral neuropathic produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v.50, p.355-363, 1992.

KLUSÁKOVÁ, I.; DUBOVÝ, P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries – an anatomical perspective. **Ann Anat**, v. 191, p. 248-259, 2009

KONG, J.; FUFA, D. T.; GERBER, A. J.; et al. Psychophysical outcomes from a randomized pilot study of manual, electro, and sham acupuncture treatment on experimentally induced thermal pain. **J Pain**, v. 6, p. 55-64, 2005.

KOO, S. T.; PARK, Y. I.; LIM, K. S.; et al. Acupuncture analgesia in a new rat model of ankle sprain pain. **Pain**, v. 99, p. 423-431, 2002.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc**, v. 18, p. 412, 1959.

KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ROBLINS, S. L. **Roblins Basic Pathology**. Saunders, 2003

LANGEVIN, H. M.; CHURCHILL, D. L.; CIPOLLA, M. J. Mechanical signaling through connective tissue: a mechanism for the therapeutic effect of acupuncture. **FASEB J**, v. 15, p. 2275-2282, 2001.

LAO, L.; ZHANG, G.; WEI, F.; BERMAN, B. M.; et al. Electroacupuncture attenuates behavioral hyperalgesia and selectively reduces spinal Fos protein expression in rats with persistent inflammation. **J Pain**, v. 2, p. 111-117, 2001.

LAUGHLIN, T. M.; BETHEA, J. R.; YEZIERSKI, R. P.; et al. Cytokine involvement in dynorphin-induced allodynia. **Pain**, v. 84, p. 159-167, 2000.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J.; Central sensitization: a gerator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **The Journal of Pain**, v. 10, p. 895-926, 2009.

LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identify. **Nat Rev Immunol**, v. 11, p. 750-761, 2011.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animals models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597-652, 2001.

LEKAN, H. A.; CARLTON, S. M.; COGGESHALL, R. E. Sprouting of a beta fibers into lamina II of the rat dorsal horn in peripheral neuropathy. **Neurosci Lett**, v. 208, p. 147-150, 1996.

LI, Y.; TOUGAS, G.; CHIVERTON, S. G.; et al. The effect of acupuncture on gastrointestinal function and disorders. **American Journal of Gastroenterology**, v. 87, p. 1372-1381, 1992.

LI, A. W.; ZHANG, J. M.; XIE, Y. K. Human acupuncture points mapped in rats are associated with excitable muscle/skin-nerve complexes with enriched nerve endings. **Brain Research**, v. 1012, p. 154-159, 2004.

LI, W. M.; CUI, K. M.; LI, N; et al. Analgesic effect of electroacupuncture on complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain in mice: a model of antipain treatment by acupuncture in mice. **Jpn J Physiol**, v. 55, p. 339-344, 2005.

LI, A.; ZHANG, R. X.; WANG, Y.; et al. Corticosterone mediates electroacupuncture-produced anti-edema in a rat model of inflammation. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, p. 7-27, 2007.

LI, A.; LAO, L.; WANG, Y.; et al. Electroacupuncture activates corticotrophin-releasing hormone-containing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus to alleviate edema in a rat model of inflammation. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, p. 8-20, 2008.

LIM, S. WHO standard acupuncture point locations. **Evid Based Complement Alternat Med**, Epub 2009 Feb 24, 2010.

LIMA, F. O.; SOUZA, G. R.; VERRI, W. A. Jr; et al. Direct blockade of inflammatory hypernociception by peripheral A1 adenosine receptors: involvement of the NO/cGMP/PKG/KATP signaling pathway. **Pain**, v. 151, p. 506-515, 2010.

LIN, Y. C. Perioperative usage of acupuncture. **Pediatric Anesthesia**, v. 16, p. 231-235, 2006.

LIN, J. G.; CHEN, W. L. Review: acupuncture analgesia in clinical trials. *Am J Chin Med*, v. 37, p. 1-18, 2009.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.

LONG, D. M.; BENDEBBA, M.; TORGERSON, W. S.; et al. Persistent back pain and sciatica in the United States: patient characteristics. **J Spinal Disord**, v. 9, p. 40-58, 1996.

LORAM, L. C.; FULLER, A.; FICK, L. G.; et al. Cytokine Profiles During Carrageenan-Induced Inflammatory Hyperalgesia in Rat Muscle and Hind Paw. **J Pain**, v. 8, p. 127-136, 2007.

LU, G. W.; LIANG, R. Z.; XIE, J. Q. Analysis of peripheral afferent fibers on effect of acupuncture analgesia at Zusanli point. **Science in China**, v. 22, p. 495-503, 1979.

LU, G. W. Characteristics of afferent fiber innervation on acupuncture points zusanli. **The American Journal of Physiology**, v. 245, p. R606-R612, 1983.

LU, Z.; CAO, W.; DONG, X.; et al. Relation of capsaicin-sensitive neurones to the effect of electro-acupuncture analgesia. **Zhen Ci Yan Jiu**, v. 15, p. 213-216, 1990.

LUMENG, C. N.; DEYOUNG, S. M.; BODZIN, J. L.; et al. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 56, p. 16-23, 2007.

LUNA, S. P. L. Emprego da acupuntura em anestesia. In: FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R.G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, p.337-343, 2002.

LUNDEBERG T, LUND I: Are reviews based on sham acupuncture procedures in fibromyalgia syndrome (FMS) valid? **Acupunct Med**, v. 25; p. 100-106, 2007.

LUO, F.; WANG, J. Y. Modulation of central nociceptive coding by acupoint stimulation. **Neurochem Res**, v. 33, p. 1950-1955, 2008.

LUSTER, A. D. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N Engl J Med**, v. 338, p. 436-445, 1998.

MA, S. X.; LI, X. Y. Increased neuronal nitric oxide synthase expression in the gracile nucleus following electroacupuncture stimulation of cutaneous hindlimb acupoints. **Acupunct Electrother Res**, v. 27, p. 157-169, 2002.

MA, S. X. Neurobiology of Acupuncture: Toward CAM. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 1, p. 41-47, 2004.

MACIOCIA, G. **Os fundamentos da medicina chinesa**. São Paulo: Roca, 1994.

MCCMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. 5. ed. London: Elsevier, 2006.

MACPHERSON, H.; ASGHAR, A. Acupuncture needle sensations associated with De Qi: a classification based on experts' ratings. **J Altern Complement Med**, v. 12, p. 633-637, 2006.

MACPHERSON, H.; SINCLAIR-LIAN, N.; THOMAS, K. Patients seeking care from acupuncture practitioners in the UK: a national survey. **Complement Ther Med**, v. 14, p. 20-30, 2006.

MALMBERG, A. B.; BASBAUM, A. I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain**, v. 76, p. 215-222, 1998.

MANHEIMER, E.; BERMAN, B. M. Letter to the Editor in response to: Ernst E, Lee MS, Choi TY. Acupuncture: Does it alleviate pain and are there serious risks? A review of reviews. **Pain**, v. 152, p. 755-764, 2011.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v. 25, p.677-686, 2004.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCCMAHON, S.B. Role of the immune system in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, p. 521-532, 2005.

MARSHALL, B. T.; LANG, M.; PIPER, J. W.; et al. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. **Nature**, v. 423, p. 190-193, 2003.

MAYER, D. J.; PRICE, D. D.; RAFFI, A. Antagonism of acupuncture analgesia in man by the narcotic antagonist naloxone. **Brain Res**, v. 121, p. 368-372, 1977.

MAYHEW, E.; ERNST, E. Acupuncture for fibromyalgia: a systematic review of randomized clinical trials. **Rheumatology**, v. 46, p. 801-804, 2007.

MAYNO, G.; JORIS, J. **Cells, Tissues and Disease**. Oxford Univ. Press, 2004.

MCCOLL, S. R.; SHOWELL, H. J. Neutrophil-derived inflammatory mediators. In: **Immunopharmacology of Neutrophils**, P. G. HELLEWELL; T. J. WILLIAMS, Eds., pp. 95–114, Academic Press, London, UK, 1994.

MACMAHON, S. B.; CAFFERTY, W. B. J.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Exp Neurol**, v. 192, p. 444-462, 2005.

MEDEIROS, M. A.; CANTERAS, N. S.; SUCHECKI, D.; et al. c-Fos expression induced by electroacupuncture at the Zusanli point in rats submitted to repeated immobilization. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, p. 1673-1684, 2003.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008

MEISEL, C.; VOGT, K.; PRATZER, C.; et al. Differential regulation of monocytic tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 expression. **Eur J Immunol**, v. 26, p. 1580-1586, 1996.

MENG, X.; ZHANG, Y.; LI, A.; et al. The effects of opioid receptor antagonists on electroacupuncture-produced anti-allodynia/hyperalgesia in rats with paclitaxel-evoked peripheral neuropathy. **Brain Res**, v. 26, p. 58-65, 2011.

MENSE, S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. **Pain**, v. 54, p. 241-289, 1993.

MEYER, R. A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J. N.; RAJA, S. N. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: **Wall & Melzack's Textbook of Pain, 6th Edition**. Elsevier, p. 1-23, 2005.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v. 57, p. 1-164, 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355-474, 2002.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathologic and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, p. 23-26, 2009.

MIZGERD, J. P.; SPIEKER, M. R.; DOERSCHUK, C. M. Early response cytokines and innate immunity: essential roles for TNF receptor 1 and type I IL-1 receptor during Escherichia coli pneumonia in mice. **J Immunol**, v. 15, p. 4042-4048, 2001.

MOGIL, J. S. Animals Models of pain: progress and challenges. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 283-294, 2009.

MOLSBERGER, A. F.; ZHOU, J.; ARNDT, D.; TESKE, W. Chinese acupuncture for chronic low back pain: an international expert survey. **J Altern Complement Med**, v. 14, p. 1089-1095, 2008.

MONTANHER, A. B.; ZUCOLOTTI, S. M.; SCHENKEL, E. P.; et al. Evidence of anti-inflammatory effects of Passiflora edulis in an inflammation model. **J Ethnopharmacol**, v. 109, p. 281-288, 2007.

MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MOREAU, M. E.; GARBACKI, N.; MOLINARO, G.; et al. The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. **J Pharmacol Sci**, v. 99, p. 6-38, 2005.

MORGAN, J. I.; COHEN, D. R.; HEMPSTEAD, J. L.; et al. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. **Science**, v. 237, p. 192-197, 1987.

MORI, H.; NISHIJO, K.; KAWAMURA, H.; et al. Unique immunomodulation by electro-acupuncture in humans possibly via

stimulation of the autonomic nervous system. **Neurosci Lett**, v. 320, p. 21-24, 2002.

MOSSER, D. M.; EDUOARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Rev Immunol**, v. 8, p. 958-968, 2008.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunol Rev**, v. 226, p. 205-218, 2008.

MUROTANI, T.; ISHIZUKA, T.; NAKAZAWA, H.; et al. Possible involvement of histamine, dopamine, and noradrenalin in the periaqueductal gray in electroacupuncture pain relief. **Brain Res**, v. 8, p. 62-68, 2010.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Rev Immunol**, v. 11, p.723-737, 2011.

NARANJO, J. R.; MELLSTROM, B.; ACHAVAL, M.; et al. Co-induction of jun B and c-fos in a subset of neurons in the spinal cord. **Oncogene**, v. 6, p. 223-227, 1991.

NASCIMENTO, F. P.; FIGUEREDO, S. M.; MARCON, R.; et al. Inosine reduces pain-related behavior in mice: involvement of adenosine A1 and A2A receptor subtypes and protein kinase C pathways. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 334, p. 590-598, 2010.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Rev Immunol**, v. 6, p 173-182, 2006.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). **Acupuncture. NIH Consensus Statement**, n. 15, p. 1-34, 1997.

NAVARRO, X.; VIVO, M.; VALERO-CABRE, A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. **Prog Neurobiol**, v. 82, p. 163-201, 2007.

NEGUS, S. S.; VANDERAH, T. W.; BRANDT, M. R.; et al. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent

advances and future challenges. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 319, p. 507-514, 2006.

NEUGEBAUER, V.; HAN, J. S; ADWANIKAR, H.; et al.
Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. **Mol Pain**, v. 3: p. 8, 2007.

NIH Consensus Conference. Acupuncture. **JAMA**, v. 280, p. 1518-1524, 1998.

OKADA, K.; KAWAKITA, K. Analgesic Action of Acupuncture and Moxibustion: A Review of Unique Approaches in Japan. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 6, p. 11-7, 2009.

PAGANO, R. L.; DIAS, M. A. A.; DALE, C. S.; et al.
Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 mediate carrageenan-induced antinociception in mice. **Mediators Inflamm**, v. 11, p. 203-210, 2002.

PARISH, C. R. Heparan sulfate and inflammation. **Nat Immunol**, v. 6, p. 861-862, 2005.

PARK, H. J.; LIM, S.; JOO, W. S.; et al. Acupuncture prevents 6-hydroxydopamine-induced neuronal death in the nigrostriatal dopaminergic system in the rat Parkinson's disease model. **Exp Neurol**, v. 180, p. 93-98, 2003.

PARK, J. H.; HAN, J. B.; KIM, S. K.; et al. Spinal GABA receptors mediate the suppressive effect of electroacupuncture on cold allodynia in rats. **Brain Res**, v. 31, p. 24-29, 2010.

PARKER, J. P. **The patient's sourcebook on peripheral neuropathy**. San Diego: ICON Group International, Inc., 2002.

PATWARDHAN, B.; WARUDE, D.; PUSHPANGADAN, P.; BHATT, N. Ayurveda and traditional Chinese medicine: a comparative overview. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2, p. 465-473, 2005.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates** (Deluxe Edition). Segunda Edição, San Diego: Academic, 2001.

PENZA, P.; BRICCHI, M.; SCOLA, A.; et al. Electroacupuncture is not effective in chronic painful neuropathies. **Pain Med**, v. 12, p. 1819-1823, 2011.

PEREIRA, R.; MEDEIROS, Y. S.; FRÖDE, T. S. Antiinflammatory effects of Tacrolimus in a mouse model of pleurisy. **Transpl Immunol**, v. 16, p. 105-111, 2006.

PERL, E. R. Ideas about pain, a historical view. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 8, p. 71-80, 2007.

PINDERSKI, L. J.; FISCHBEIN, M. P.; SUBBANAGOUNDER, G.; et al. Overexpression of interleukin-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes. **Circ Res**, v. 31, p. 1064-1071, 2002.

PLATZER, C.; MEISEL, C.; VOGT, K.; et al. Up regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor alpha and c AMP elevating drugs. **Int Immunol**, v. 7, p. 517-523, 1995

PLATZER, C.; FRITSCH, E.; ELSTNER, T.; et al. Cyclic adenosine monophosphate responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. **Eur J Immunol**, v. 29, p. 3098-3104, 1999.

PLATZER, C.; DOCKE, W. D.; VOLK, H. D.; et al. Catecholamines trigger IL-20 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter / enhancer activity in monocytic cells. **J Neuroimmunol**, v. 105, p. 31-38, 2000.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Rev Immunol**, v. 7, p. 803-815, 2007

POCKETT, S. Spinal cord sympathetic plasticity and chronic pain. **Anesth Analg**, v. 80, p.173-179, 1995.

PORCHERAY, F.; VIAUD, S.; RIMANIOL, A. C.; et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. **Clin Exp Immunol**, v. 142, p. 481-489, 2005.

PORTENOY, R. K. Pain Specialists and Addiction Medicine Specialists Unite to Address Critical Issues. **American Pain Society Bulletin**, v. 9, 1999.

POVOLNY, B. Acupuncture and traditional chinese medicine: an overview. **Tech Reg Anesth Pain Manag**, v. 12, p. 109-110, 2008.

PUIG, S.; SORKIN, L. S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. **Pain**, v. 64, p. 345-355, 1996.

RADHAKRISHNANA, R.; MOOREC, S. A.; SLUKA, K. A. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. **Pain**, v. 104, p. 567-577, 2003.

RAUSCHER, F. J.; SAMBUCETTI, L. C.; CURRAN, T.; et al. Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. **Cell**, v. 52, p. 471-480, 1988.

REN, X. X.; GUO, M. W.; ZHAO, Y. F.; et al. Effects of electroacupuncture on pain reactions, expression of spinal kappa-opioid receptor and contents of enkephalin and beta-endorphin in periaqueductal gray of midbrain in dysmenorrhea model rats. **Zhen Ci Yan Jiu**, v. 37, p. 1-7, 2012.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 387, p.111-118, 2000.

RICARDO, S. D.; VAN GROOR, H.; EDDY, A. A. Macrophage diversity in renal injury and repair. **J Clin Invest**, v. 118, p. 3522-3530, 2008.

RIESE, V.; BRENNER, S.; DOCKE, W. D.; et al. Catecholamines induce IL-10 release in patients suffering from acute myocardial

infarction by transactivating its promoter in monocytic but not in T cells. **Mol Cell Biochem**, v. 212, p. 45-50, 2000

RIN, K.; DUBNER, R. Descending modulation in persistent pain: an update. **Pain**, v. 100, p. 1-6, 2002.

RISTOL, E. G. A. Acupuntura y neurología. **Revista de Neurologia**, v. 25, p. 894-898, 1997.

RITTNER, H. L.; MACHELSKA, H.; STEIN, C. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. **J Leukoc Biol**, v. 78, p.1215-1222, 2005.

RITTNER, H. L.; MACHELSKA, H.; STEIN, C. Imune system pain and analgesia. In: **Science of Pain** (Oxford: Academic Press), A.I. Basbaum and M. Bushnell Eds, p.407-427, 2009.

RONG, P.; ZHU, B.; LI, Y.; et al. Mechanism of acupuncture regulating visceral sensation and mobility. **Front Med**, v. 5; p. 151-156, 2011.

ROSS, J. **Combinações dos Pontos de Acupuntura**. São Paulo: Roca, 2002.

RUSSO, C. M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Annu Rev Med**, v. 49, p. 123-133, 1998.

SAAD, N. E.; JABLUR, S. J. Nociceptive behavior in animal models for peripheral neuropathy: spinal and supraspinal mechanisms. **Prog Neurobiol**, v. 86, p. 22-47, 2008.

SABAT, R. IL-10 family of cytokines. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 21, p. 315-324, 2010.

SANTOS, A. R.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A.; et al. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 289, p. 417-426, 1999.

SANTOS, A. R.; GADOTTI, V. M.; OLIVEIRA, G. L.; et al. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology**, v. 48, p. 1021-1034, 2005.

SANTOS, F. A. S.; GOUVEIA, G. C.; MARTELLI, P. J. L.; et al. Acupuntura no sistema único de saúde e a inserção de profissionais não-médicos. **Rev Bras Fisioter**, v. 13, p. 330-334, 2009.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Rev Immunol**, v. 10, p. 170-181, 2010.

SAWYNOK, J.; REID, A.; POON, A. Peripheral antinociceptive effect of an adenosine kinase inhibitor, with augmentation by an adenosine deaminase inhibitor, in the rat formalin test. **Pain**, v. 74, p. 75-81, 1998.

SCHAIBLE, H-G.; SCHMIDT, R.F.; WILLIS, W.D. Enhancement of the responses of ascending tract cells in the cat spinal cord by acute inflammation of the knee joint. **Exp Brain Res**, v. 66, p. 489-499, 1987.

SCHAIBLE, H-G.; EBERSBERGER, A.; VON BANCHET, G.S. Mechanisms of pain in arthritis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 966, p. 343-354, 2002.

SCHAIBLE, H. G.; VON BANCHET, G. S.; BOETTGER, M. K.; et al. The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1193, p. 60-69, 2010.

SCHLIESSBACH, J.; van der KLIFT, E.; SIEGENTHALER, A.; et al. Does Acupuncture Needling Induce Analgesic Effects Comparable to Diffuse Noxious Inhibitory Controls? **Evid Based Complement Alternat Med**, Epub 2011 Jul 5, 2012.

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V.; BECHARA, G. H.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Effect of various acupuncture treatment protocols upon sepsis in Wistar rats. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1026, p. 251-256, 2004.

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V.; BECHARA, G. H.; CUNHA, F. Q. Effect of acupuncture on TNF- α , IL-1 β and IL-10 concentrations in the peritoneal exudates of carrageenan-induced peritonitis in rats. **Ciência Rural**, v. 35, p. 103-108, 2005.

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V. R.; BECHARA, G. H. Acupuntura: histórico, bases teóricas e sua aplicação em Medicina Veterinária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p.491-500, 2010.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, p. 205-218, 1990.

SENNA-FERNANDES, V.; FRANÇA, D. L.; SOUZA, D. et al. Acupuncture at ‘Zusanli’ (St.36) and ‘Sanyinjiao’ (SP6) points on the gastrointestinal tract: a study of the bioavailability of 99mTc sodium pertechnetate in rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2011:823941. Epub 2010 Oct 18, 2011.

SERBINA, N. V.; SALAZAR-MATHER, T. P.; BIRON, C. A.; et al. TNF/ α /iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. **Immunity**, v. 19, p. 59-70, 2003.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1191-1197, 2005.

SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 101-137, 2007.

SHANG, C. Electrophysiology of growth control and acupuncture. **Life Sciences**, v. 68, p. 1333-1342, 2011.

SHE, Y. F.; QI, C. H.; ZHU, J. History and progress of study on electrical properties of acupoints at home and abroad. **Zhongguo Zhen Jiu**, v. 30, p. 1047-1050, 2010.

SHEN, E.; WU, W. Y.; DU, H. J.; et al. Electromyographic activity produced locally by acupuncture manipulation. **Chin Med J**, v. 9, p. 532-535, 1973.

SHEN, J. Research on the neurophysiological mechanisms of acupuncture: review of selected studies and methodological issues. **J Altern Complement Med**, v. 7, p. 121-127, 2001.

SHERRINGTON, C. S. **The integrative action of the nervous system**. Cambridge Univ Press, Cambridge, UK, 1906.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, p. 385-405, 2004.

SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 11, p. 762-774, 2011.

SKILLING, S. R.; SMULLIN, D. H.; BEITZ, A. J.; et al. Extracellular amino acid concentrations in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridine and nociceptive stimulation. **J Neurochem**, v. 51, p. 127-132, 1988.

SNIDER, W. D.; MACMAHON, S. B. Tracking pain at the source: new ideas about nociceptors. **Neuron**, v. 4, p. 629-632, 1998.

SOCIEDADE BRASILEIRA PARRA O ESTUDO DA DOR. **Jornal dor**. Ano X, 2010, n. 38.

SORKIN, L. S.; YAKSH, T. L. Behavioral models of pain states evoked by physical injury to the peripheral nerve. **Neurotherapeutics**, v. 6, p. 609-619, 2009

SOUVANNAKITTI, L.; AKASEREENONT, P.; KETSA-ARD, K.; et al. Platelet serotonin in headache patients treated by new trend acupuncture. **Proceedings of the 7th World Congress on Pain**, 1993.

SUTTERWALA, F. S.; NOEL, G. J.; CLYNES, R.; MOSSER, D. M. Selective suppression of interleukin-12 induction after

macrophage receptor ligation. **J Exp Med**, v. 185, p. 1977-1985, 1997.

SUTTERWALA, F. S.; NOEL, G. J.; SALGAME, P.; MOSSER, D. M. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fcgamma receptor type I. **J Exp Med**, v. 188, p. 217-222, 1998.

SWEITZER, S. M.; WONG, S. M.; PETERS, M.C.; et al. Protein kinase C epsilon and gamma: involvement in formalin-induced nociception in neonatal rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 309, p. 616-625, 2004.

TABOSA, A.; YAMAMURA, Y.; FORNO, E.R.; MELLO, L.E. Effect of the acupoints ST-36 (Zusanli) and SP-6 (Sanyinjiao) on intestinal myoelectric activity of Wistar rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, p. 731-739, 2002.

TAFFAREL, M. O.; FREITAS, P. M. C. Acupuntura e analgesia: aplicações clínicas e principais acupontos. **Ciência Rural**, v.39, p. 2665-2672, 2009.

TAKANO, T.; CHEN, X.; LUO, F.; et al. Traditional acupuncture triggers a local increase in adenosine in human subjects. **J Pain**, v. 13, p. 1215-1223, 2012.

TAKESHIGE, C.; SATO, T.; MERA, T.; et al. Descending pain inhibitory system involved in acupuncture analgesia. **Brain Res Bull**, v. 29, p. 617-634, 1992.

TANDRUP, T.; WOOLF, C. J.; COGGESHALL, R. E. Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transaction of the rat sciatic nerve. **J Comp Neurol**, v. 422, p. 172-180, 2000.

TAYLOR, P.; BROWN, J. H. Nicotinic receptors. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, editors. **Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects** (Philadelphia): Raven Press, p. 248-254, 1994.

TAYLOR, B. K.; PETERSON, M. A.; BASBAUM, A. I. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to

subcutaneous formalin require peripheral nerve input. **J Neurosci**, v. 15, p. 7575-7584, 1995.

TIDBALL, J. G.; VILLALTA, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, p. 1173-1187, 2011.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: Dickenson, A.; Besson, J. (eds). **The Pharmacology of pain. Springer**, v. 130/I, p. 1-20, 1997.

TONG, Y.; GUO, H.; HAN, B. Fifteen-day acupuncture treatment relieves diabetic peripheral neuropathy. **J Acupunct Meridian Stud**, v. 3, p. 95-103, 2010.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, p. 853-859, 2002.

TRACEY, I.; MANTYH, P. W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**, v. 55, p. 377-391, 2007.

TRAUB, R. J.; STITT, S.; GEBHART, G. F. Attenuation of c-Fos expression in the rat lumbosacral spinal cord by morphine or tramadol following noxious colorectal distention. **Brain Research**, v. 701, p. 175-182, 1995.

VALE, M. L.; MARQUES, J. B.; MOREIRA, C. A.; et al. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 304, p. 102-108, 2003.

VALLAT, J. M.; MAGY, L. Neuropathies périphériques: généralités. **EMC-Neurologic**, v. 2, p. 175-181, 2005.

VANEGAS, H.; SCHAILBE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Rev**, v. 46, p. 295-309, 2004.

VERAS, R. P.; PARAHYBA, M. I. O anacronismo dos modelos assistenciais para os idosos na área da saúde: desafios para o setor privado. **Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca**, v. 23, n. 10, p. 2479-2489, out./2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/csp/v23n10/22.pdf>>. Acesso em: ago. 2009.

VILLALTA, S.A., NGUYEN, H.X., DENG, B., et al. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. **Hum Mol Genet**, v. 18, p. 482-496, 2009.

VILLALTA, S. A.; RINALDI, C.; DENG, B.; et al. Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. **Hum Mol Genet**, v. 20, p. 790-805, 2011.

VOSCOPOULOS, C.; LEMA, M. When does acute pain become chronic? **British Journal of Anaesthesia**, v. 105, p. 69-85, 2010.

WALTER, R. Y.; RASMUSSEN, L. A. RAINIER, J. D. et al. ASIC1 and ASIC3 Play Different Roles in the Development of Hyperalgesia Following Inflammatory Muscle Injury. **J Pain**, v. 11, p. 210-218, 2010.

WANG, C. Y.; YU, B.; LIU, X. C. The influence of acupuncture on the acetylcholine level in various regions of rat brain. **Proc Natl Symp Acupuncture, Moxibustion and Acupuncture Anaesthesia**, p. 444, 1979.

WANG, D.; AUDETTE, J.F. Acupuncture in Pain management. In: AUDETTE, J.F.; BAILEY, A. **Integrative pain medicine**. Boston: Humana Press, p. 379-416, 2008.

WANG, S. M.; KAIN, Z. N.; WHITE, P. Acupuncture analgesia: I. The scientific basis. **Anesth Analg**, v. 106, p. 602-610, 2008.

WANG, H.; XU, T.; LEWIN, M. R. Future possibilities for the treatment of septic shock with herbal components. **Am J Emerg Med**, v. 27, p. 107-112, 2009.

WASEMAN, S. G.; CUMMINS, T. R. DIB-HAJJ, S.; et al. Sodium channels, excitability of primary sensory neurons, and the molecular basis of pain. **Muscle Nerve**, v. 22, p. 1177-1187, 1999.

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Spinal cord glia: new players in pain. **Pain**, v. 93, p. 201-205, 2001.

WAXMAN, S. G.; CUMMINS, T. R.; DIB-HAJJ, S.; et al. Sodium channels, excitability of primary sensory neurons, and the molecular basis of pain. **Muscle Nerve**, v. 22, p. 1177-1187, 1999.

WHITTLE, B. A. The use of chances in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and non narcotic analgesics. **Br J Pharmac Chermother**, v. 22, p. 246-253, 1964.

WITTERT, G.; HOPE, P.; PYLE, D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 26, p. 877-881, 1996.

WOICIECHOWSKY, C.; ASADULLAH K.; NESTLER, D.; et al. Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. **Nat Med**, v. 4, p. 808-813, 1998.

WOOD, P. L. The significance of multiple CNS opioid receptor types: a review of critical considerations relating to technical details and anatomy in the study of central opioid actions. **Peptides**, v. 9, p. 49-55, 1988.

WOOLF, C. J.; SHORTLAND, P. REYNOLDS, M.; et al. Reorganization of central terminal of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral anatomy. **J Comp Neurol**, v. 360, p. 121-134, 1995.

WOOLF, C. J.; COSTIGAN, M. Transcriptional and post translational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p.7723-7730, 1999.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765-1769, 2000.

WOOLF, C. J.; MA, O. Nociceptors – noscious stimulus detectors. **Neuron**, v. 55, p. 353-364, 2007.

WORLD FEDERATION OF ACUPUNCTURE AND MOXIBUSTION SOCIETIES. Beijing: **WFAMS News Center**, 07 de junho de 2006. Online. Disponível em: <http://www.wfas.org.cn/en/>. Acesso em: 21 jan 2013.

WU, C. P.; CHAO, C. C.; ZHAO, Z. Q.; WEI, J. Y. Inhibitory effect produced by stimulation of afferent nerves on responses of cat dorsolateral fasciculus fibers to nocuous stimulus. **Sci Sin**, v. XVII, p. 688-697, 1974.

WU, J.; DENG, X. The mast cell biologically-active substances and electroacupuncture analgesic effect. **Proceedings of the 7th World Congress on Pain**; Seattle, WA: IASP Press 429, 1993.

WU, W. P.; HAO, J. X.; HALLDNER, L.; et al. Increased nociceptive response in mice lacking the adenosine A1 receptor. **Pain**, v. 113, p. 395-404, 2005.

WYNN, T. A. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. **Nature Rev Immunol**, v. 4, p. 583-594, 2004.

WYNN, T. A.; BARROM, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. **Semin Liver Dis**, v. 30, p. 245-257, 2010.

XIAO, H. S.; HUANG, Q. H.; ZHANG, F. X.; et al. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, p. 8360-8365, 2002.

XIAO, W.; HONG, H.; KAWAKAMI, Y.; et al. T. Regulation of myeloproliferation and M2 macrophage programming in mice by Lyn/HCK; Shipand Stat 5. **J Clin Invest**, v. 118, p. 924-934, 2008.

XU, W. R.; HUA, B. J.; HOU, W.; BAO, Y. J. Clinical randomized controlled study on acupuncture for treatment of peripheral

neuropathy induced by chemotherapeutic drugs. **Zhongguo Zhen Jiu**, v. 30, p. 457-460, 2010.

YAMAMURA, Y. **Acupuntura tradicional: a arte de inserir**. São Paulo: Roca, 2001.

YAKEU, G.; BUTCHER, L.; ISA S.; et al. Low intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: Roles of PPARY and the cytokines. **Atherosclerosis**, v. 212, p. 669-673, 2010.

YAKSH, T. L. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. **Trends Pharmacol Sci**, v. 20, p. 329-337, 1999.

YANG, J.; YANG, Y.; CHEN, J. M.; et al. Effect of hypothalamic supraoptic nucleus on acupuncture analgesia in the rat. **Brain Res Bull**, v. 28, p. 681-686, 2008.

YENG, L.T.; TEIXEIRA, M.J. Tratamento multidisciplinar dos doentes com dor crônica. **Prática Hospitalar**, v. 35, 2004.

YIM, Y. K.; LEE, H.; HONG, K. E.; et al. Anti-inflammatory and Immune-regulatory Effects of Subcutaneous Perillae Fructus Extract Injections on OVA-induced Asthma in Mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 7, p. 79-86, 2010.

YIN, C. S.; JEONG, H. S.; PARK, H. J.; et al. A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Res Vet Sci**, v. 84, p. 159-165, 2008.

YU, J.; ZHAO, C.; LUO, X. The effects of electroacupuncture on the extracellular signal-regulated kinase 1/2/P2X3 signal pathway in the spinal cord of rats with chronic constriction injury. **Anesth Analg**, v. 116, p. 239-246, 2013.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.

ZHANG, R. X.; LAO, L.; QIAO, J. T.; et al. Endogenous and exogenous glucocorticoid suppresses up-regulation of preprodynorphin mRNA and hyperalgesia in rats with peripheral inflammation. **Neurosci Lett**, v. 8, p. 85-8, 2004. (a)

ZHANG, W. T.; JIN, Z.; LUO, F.; et al. Evidence from brain imaging with fMRI supporting functional specificity of acupoints in humans. **Neurosci Lett**, v. 354, p. 50-53, 2004. (b)

ZHANG, D.; DING, G. H.; SHEN, X. Y.; et al. Influence of mast cell function on the analgesic effect of acupuncture of “Zusanli” (ST 36) in rats. **Acupunct Res**, v. 31, p. 147-152 (in Chinese, English abstract), 2007.

ZHANG, H.; BIAN, K.; LIN, Z. Are acupoints specific for diseases? A systematic review of the randomized controlled trials with sham acupuncture controls. **Chinese Medicine**, v. 5, p. 1-7, 2010.

ZHANG, Z. J.; WANG, X. M.; MCALONAN, G. M. Neural Acupuncture Unit: A New Concept for Interpreting Effects and Mechanisms of Acupuncture. **Evid Based Complement Alternat Med**, Mar 8, Epub 2012.

ZHAO, Z. Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Progress in Neurobiology**, v. 85, p. 355-375, 2008.

ZHOU, F.; HUANG, D.; XIA, Y. "Neuroanatomical basis of acupuncture points" in **Acupuncture Therapy for Neurological Diseases: A Neurobiological View**, Y. Xia, G. Wu, X. Cao et al., Eds., chapter 2, p. 32-80, Tsinghua University Press, Beijing, China, 2010.

ZOCHODNE, D. N. **Neurobiology of peripheral nerve regeneration**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.

ZYLKA, M. J. Needling adenosine receptors for pain relief. **Nat Neurosci**, v. 13, p. 783-784, 2010.